



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**“Evaluación de la actividad mitocondrial como
parámetro de calidad espermática pre y post
criopreservación en *Apis mellifera* de Pichanaki,
Junín”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo

AUTOR

Christian Emilio CANCHO CCAICO

ASESOR

Mg. Martha Esther VALDIVIA CUYA

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Cancho, Ch. (2019). *Evaluación de la actividad mitocondrial como parámetro de calidad espermática pre y post criopreservación en Apis mellifera de Pichanaki, Junín*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 11:05 horas del 02 de mayo de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** de **CHRISTIAN EMILIO CANCHO CCAICO**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 002-EPGB-2019, el titulando expuso su tesis: **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL COMO PARÁMETRO DE CALIDAD ESPERMÁTICA PRE Y POST CRIOPRESERVACIÓN EN *Apis mellifera* DE PICHANAKI, JUNÍN”** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19..., calificativo: Aprobado con máximos honores

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** a **CHRISTIAN EMILIO CANCHO CCAICO** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 12:05 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 02 de mayo de 2019.


Dra. FANNY LAZO MANRIQUE
(PRESIDENTA)


Mg. MARTHA VALDIVIA CUYA
(ASESORA)


Blga. MARGARITA VELASQUEZ REINOSO
(MIEMBRO)


Blga. ROSA GONZALES GONZALES
(MIEMBRO)

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a mi profesora, mentora y asesora, la Dra. Martha Esther, Valdivia Cuya, por su dedicación y apoyo que ha brindado a este trabajo, por las oportunidades brindadas, por el respeto a mis ideas y por la dirección y el rigor que ha facilitado a las mismas. Gracias por la confianza ofrecida desde que llegué a su laboratorio.

A INNOVATE PERÚ por el financiamiento con el convenio N° 300-FIDECOM-INNOVATEPERU-PIMEN-2017 y al programa de Promoción de Tesis de Pregrado RR N° 5969-R-18, Proyecto con código B18100024 que me fue otorgado por la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Asimismo, agradezco a mis hermanos del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción, por su apoyo personal y humano, especialmente a la Srta. Tania, que hacía de los viajes más largos los más amenos, el Profesor Bravo, que me hizo entender que uno debe defender sus ideas hasta el final, aun cuando ya no haya más que decir, a Mapi, por su sinceridad y apoyo en las últimas semanas de este camino, a Paty, por sus ocurrencias y por su capacidad de alegrarle el día hasta al ser más aburrido, a Cathy por su tolerancia y frescura, a Rubén, Jacky y Emanuel por su fidelidad y confianza con quien he compartido proyectos e ilusiones durante estos años.

Un especial agradecimiento a Diego, Cecilia, Héctor, Lourdes, Stefanny y Ángel, por su apoyo para llevar a cabo este gran proyecto y como consecuencia mi tesis, por su puntualidad y cumplimiento.

Un trabajo de investigación es siempre fruto de ideas, proyectos y esfuerzos previos, pero también del apoyo entre investigadores. En este caso mi más sincero agradecimiento a la Dra. Susana Gutiérrez del laboratorio de biotecnología microbiana,

y a sus colaboradores: Miguel, Ingrid y Kevin, por su tiempo y su amabilidad para facilitarme uno de sus equipos más preciados.

Por su orientación y atención a mis consultas sobre la revisión de este escrito, mi agradecimiento a mis profesoras Margarita Velasquez Reinoso y Rosa Gonzales Gonzales. Finalmente, gracias a la Dra. Fanny Lazo Manrique, por la revisión cuidadosa que ha realizado de este texto y sus valiosas sugerencias en momentos de duda.

Pero un trabajo de investigación es también fruto del reconocimiento y del apoyo vital que nos ofrecen las personas que nos estiman, sin el cual no tendríamos la fuerza y energía que nos anima a crecer como personas y como profesionales.

Gracias a mis padres, Ilaria y Emiliano por sus sabios consejos, su comprensión, su apoyo incondicional a lo largo de todos estos años y por la confianza entregada a mis nuevos proyectos. A mi novia Johana Patricia, por compartir todos estos años conmigo por impulsarme a ser cada día mejor de lo que soy y por su amor incondicional. A mis hermanos Sandra y Gregorio por mostrarme siempre que cada día debo aspirar a algo mejor, por sus consejos y lecciones de vida. Gracias a mis amigos y colegas de promoción, que siempre me han prestado un gran apoyo moral y humano, necesarios en los momentos difíciles de este trabajo y esta profesión.

Pero, sobre todo, gracias a la vida por permitir que me divierta y permitirme divertir a las demás personas.

A todos, muchas gracias

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a todos los futuros grupos del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción, todos somos reconocidos en el lugar al que llegamos por nuestro esfuerzo y nuestra fidelidad.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA	iii
ÍNDICE	iv
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	vii
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO-CONCEPTUAL.....	4
2.1 Apicultura	4
2.1.1. Abejas: <i>Apis mellífera</i>	5
2.1.2 Factores ambientales y sus problemas en el campo de la reproducción.....	6
2.2. Espermatogénesis y el espermatozoide	7
2.2.1. Evaluación del estado de los espermatozoides	8
2.2.1.1 Parámetros espermáticos convencionales	8
2.2.1.2 Parámetros espermáticos no convencionales	10
2.2.2. Actividad mitocondrial en espermatozoides	10
2.3 Criopreservación de espermatozoides.....	11
2.3.1. Crioprotectores penetrantes y no penetrantes	12
2.3.2. Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos.....	13
2.3.3. Efecto de la criopreservación en la viabilidad espermática	15
2.4 Radicales libres.....	16
2.4.1 Estrés oxidativo – Peroxidación lipídica.....	¡Error! Marcador no definido.
2.5 Criocapacitación: Capacitación inducida por el proceso de criopreservación	20
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVO	21
3.1 Hipótesis.....	21
3.2 Objetivos	21
3.2.1 Objetivo general.....	21
3.2.2 Objetivos específicos	21
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	22
4.1 Materiales.....	22
4.1.1 Material biológico.....	22
4.1.2 Insumos químicos.....	23
4.1.3 Equipos y materiales de laboratorio	23

4.2 Métodos.....	24
4.2.1 Evaluación de espermatozoides pre criopreservación	24
4.2.1.1 Preparación del medio de nutrición HAM F-10 (Anexo 2)	24
4.2.1.2 Obtención y preparación de los espermatozoides para la evaluación pre criopreservación	26
4.2.2 Evaluación de la actividad mitocondrial y estrés oxidativo	27
4.2.2.1.1 Producción de estándares.....	28
4.2.2.4 Cuantificación espectrofotométrica del formazán	31
4.2.2.4.1 Liberación de sales de formazán, mediante sonicación.....	31
4.2.2.4.2 Liberación de sales de formazán, mediante KOH 2M.....	32
4.2.3 Integridad de la membrana espermática	32
4.2.4 Concentración espermática	33
4.2.5 Criopreservación y evaluación de espermatozoides post criopreservación .	34
4.2.5.1 Congelamiento.....	34
4.2.5.2 Evaluación de espermatozoides post criopreservación	34
4.2.6 Análisis e interpretación de resultados	36
V. RESULTADOS.....	37
5.1 Curva de calibración.....	37
5.2 Obtención de sales de formazán.....	40
5.2.1 Comparación de los métodos de liberación de sales de formazán por sonicación y el método de lisis con KOH 2M	40
5.2.2 Liberación de sales de formazán por lisis con KOH 2M en zánganos artificialmente y naturalmente producidos	40
5.3 Resultados pre criopreservación de la temporada artificial y natural	42
5.3.1 Parámetros espermáticos de los zánganos durante la temporada artificial..	42
5.3.2 Actividad mitocondrial de los espermatozoides de la temporada artificial	44
5.3.3 Estrés oxidativo de los espermatozoides de la temporada artificial	46
5.3.4 Parámetros espermáticos de los zánganos durante la temporada natural ...	48
5.3.5 Actividad mitocondrial de los espermatozoides de la temporada natural.....	49
.....	51
5.3.6 Estrés oxidativo de los espermatozoides de la temporada natural	51
5.4 Resultados post criopreservación de la temporada artificial y natural	54
5.4.1 Parámetros espermáticos de los zánganos durante la temporada artificial..	54
5.4.2 Actividad mitocondrial de los espermatozoides de la temporada artificial	55
5.4.3 Estrés oxidativo de los espermatozoides de la temporada artificial	57
5.4.4 Parámetros espermáticos de los zánganos durante la temporada natural ...	58

5.4.5 Actividad mitocondrial de los espermatozoides de la temporada natural.....	59
5.4.6 Estrés oxidativo de los espermatozoides de la temporada natural	61
5.5 Comparación de los parámetros espermáticos pre y post criopreservación en la temporada artificial y natural.....	63
5.5.1 Comparación de la movilidad espermática total de la temporada artificial ...	63
5.5.2 Comparación de la integridad de membrana de la temporada artificial	64
5.5.3 Comparación de la actividad mitocondrial de la temporada artificial	65
5.5.4 Comparación de los niveles de estrés oxidativo de la temporada artificial ...	66
5.5.5 Comparación de la movilidad espermática total de la temporada natural.....	68
5.5.6 Comparación de la integridad de membrana de la temporada natural.....	69
5.5.7 Comparación de la actividad mitocondrial de la temporada natural.....	70
5.5.8 Comparación de los niveles de estrés oxidativo de la temporada natural ...	71
5.6 Comparación de los parámetros espermáticos entre la temporada artificial y natural.....	72
VI. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	74
VII. CONCLUSIONES.....	81
VIII. RECOMENDACIONES	82
X. ANEXOS	99
10.1 Anexo 1 – Resumen del número de zánganos trabajados en la temporada artificial y natural.....	99
10.2 Anexo 2 - Preparación del medio de nutrición HAM F-10.....	100
10.3 Anexo 3 - Lisis celular.....	100
10.4 Anexo 4 – Diferencia significativa entre colmenas pre criopreservación de la segunda temporada para el MET%.....	101
10.5 Anexo 5 – Diferencia significativa entre colmenas pre criopreservación de la segunda temporada para la integridad de membrana.....	101
10.6 Anexo 6 – Diferencia significativa entre colmenas pre criopreservación de la segunda temporada para la actividad mitocondrial.....	102
10.7 Anexo 7 – Relación de colmenas expuestas a mitocidas y agroquímicos de la temporada artificial y de la temporada natural.....	102

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Datos de absorbancia obtenidas a diferentes concentraciones en µg/mL de formazán.....	38
Tabla 2. Peso de formazán recuperado de las muestras sometidas a sonicación y a lisis con KOH 2M.....	41
Tabla 3. Peso de formazán recuperado de las muestras sometidas a lisis con KOH 2M para ambas temporadas pre criopreservación.....	41
Tabla 4. Resultados de los parámetros espermáticos pre y post criopreservación de la temporada artificial, concentración expresada en millones de espermatozoides/mL.....	43
Tabla 5. Cuadro resumen de la media \pm SEM de los grupos pre y post criopreservación y valores de significancia de la correlación entre los parámetros de calidad espermática de la temporada artificial	43
Tabla 6. Cuadro resumen de la media \pm SEM de los grupos pre y post criopreservación y valores de significancia de la correlación entre los parámetros de calidad espermática de la temporada natural.....	49
Tabla 7. Resultados de los parámetros pre y post criopreservación de la temporada natural, concentración expresada en millones de espermatozoides/mL.....	53
Tabla 8. Niveles de significancia entre las muestras pre y post criopreservación de la temporada artificial y natural.....	67
Tabla 9. Niveles de significancia entre la temporada artificial y natural de las muestras pre criopreservación.....	73
Tabla 10. Niveles de significancia entre la temporada artificial y natural de las muestras post criopreservación	73

Figura 1.	Jaulas para el transporte de zánganos y obreras.....	23
Figura 2.	Equipo de criopreservación CL 3300®.....	24
Figura 3.	Flujograma de trabajo para la evaluación de la calidad espermática pre y post criopreservación.....	25
Figura 4.	Disección de zánganos en cámara de flujo laminar.....	27
Figura 5.	Reducción del nitroblue de tetrazolium a cristales de formazán.....	28
Figura 6.	Producción de estándares.....	28
Figura 7.	Preparación del sistema de óxido reducción en lámina.....	30
Figura 8.	Preparación del sistema de óxido reducción en tubo de microcentrífuga de 1.5mL.....	31
Figura 9.	Sonicador (MISONIX®).....	32
Figura 10.	Curva de congelamiento para espermatozoides de zángano. (Valdivia & Temoche, 2016).....	35
Figura 11.	Curva de calibración del formazán.....	39
Figura 12.	Correlación entre la movilidad espermática total y la integridad de membrana correspondiente a los espermatozoides de la temporada artificial pre criopreservación.....	44
Figura 13.	Gráficos de correlación correspondiente a los espermatozoides de la temporada artificial pre criopreservación.....	45
Figura 14.	Gráficos de correlación entre la actividad mitocondrial y la cantidad generada de formazán correspondientes a los espermatozoides de la temporada artificial pre criopreservación.....	46
Figura 15.	Gráficos de correlación correspondiente a los espermatozoides de la temporada artificial pre criopreservación.....	47
Figura 16.	Correlación entre la movilidad espermática total y la integridad de membrana correspondientes a espermatozoides de la temporada natural pre criopreservación.....	48

Figura 17. Correlación entre la movilidad espermática total y la actividad mitocondrial correspondientes a espermatozoides de la temporada natural pre criopreservación.....	50
Figura 18. Correlación entre la integridad de membrana y la actividad mitocondrial correspondientes a espermatozoides de la temporada natural pre criopreservación.....	50
Figura 19. Correlación entre la actividad mitocondrial y la cantidad generada de formazán en microgramos correspondientes a espermatozoides de la temporada natural pre criopreservación.....	51
Figura 20. Gráficos de correlación correspondiente a los espermatozoides de la temporada natural pre criopreservación.....	52
Figura 21. Correlación entre la movilidad espermática total y la integridad de membrana correspondiente a los espermatozoides de la temporada artificial post criopreservación.....	54
Figura 22. Correlación entre la movilidad espermática total y los espermatozoides con actividad mitocondrial correspondiente a la temporada artificial post criopreservación.....	55
Figura 23. Gráficos de correlación correspondiente a los espermatozoides de la temporada artificial post criopreservación.....	56
Figura 24. Correlación entre la movilidad espermática total y la cantidad generada de formazán en microgramos de 6 millones de espermatozoides correspondientes a espermatozoides de la temporada artificial post criopreservación.....	57
Figura 25. Correlación entre la integridad de membrana y la cantidad generada de formazán correspondientes a espermatozoides de la temporada artificial post criopreservación.....	58
Figura 26. Correlación entre la movilidad espermática total y la integridad de membrana correspondiente a los espermatozoides de la temporada natural post criopreservación.....	59
Figura 27. Gráficos de correlación correspondiente a los espermatozoides de la temporada natural post criopreservación.....	60

Figura 28. Correlación entre la actividad mitocondrial y la cantidad generada de formazán correspondiente a espermatozoides de la temporada natural post criopreservación.....	61
Figura 29. Gráficos de correlación correspondiente a los espermatozoides de la temporada natural post criopreservación.....	62
Figura 30. Gráfico de movilidad espermática total de la temporada artificial.....	63
Figura 31. Gráfico de integridad de membrana de la temporada artificial.....	64
Figura 32. Gráfico de la actividad mitocondrial de la temporada artificial.....	65
Figura 33. Gráfico de los pesos de formazán generados de la temporada artificial.....	66
Figura 34. Gráfico de movilidad espermática total de la temporada natural.....	68
Figura 35. Gráfico de integridad de membrana de la temporada natural.....	69
Figura 36. Gráfico de la actividad mitocondrial de la temporada natural.....	70
Figura 37. Gráfico de los pesos de formazán generados de la temporada natural.....	71

RESUMEN

Las abejas son insectos sociales de gran interés económico y ecológico, la disminución de su población ha sido registrada durante las últimas tres décadas. Dentro de este grupo de insectos existen tres tipos de abejas melíferas: Reina, obreras y zánganos, ellas tienen diferentes papeles en una colonia, siendo de mayor interés en este estudio la evaluación de espermatozoides de los zánganos pre y post criopreservación para su uso en programas de inseminación artificial (IA) de abejas reina.

El objetivo de este trabajo fue acondicionar dos métodos de evaluación de los parámetros espermáticos que permitan seleccionar de forma rigurosa grupos de abejas con mejores cualidades reproductivas. Se evaluaron los parámetros espermáticos convencionales (movilidad, integridad de membrana y concentración espermática) pre y post criopreservación de la temporada artificial y natural a partir de las vesículas seminales de 489 zánganos pertenecientes a la Asociación de Apicultores Agroecológicos “Abejas de Pichanaki”. Se registró una correlación positiva entre los parámetros convencionales y la actividad mitocondrial, $p < 0.05$ y una correlación negativa entre los parámetros convencionales y los niveles de estrés oxidativo, $p > 0.05$ en ambas temporadas. Los espermatozoides mostraron diferencias luego de la criopreservación en la movilidad y la integridad de membrana ($p < 0.05$) aunque no en la actividad mitocondrial y el estrés oxidativo. Se reporta una diferencia significativa de las muestras pre criopreservadas entre las temporadas en la movilidad, actividad mitocondrial y nivel de estrés oxidativo ($p < 0.05$) aunque no en la integridad de membrana. Se concluye entonces que es posible considerar a la actividad mitocondrial como una prueba para caracterizar mejor la calidad espermática.

Palabras Clave: *Apis mellifera*, criopreservación, actividad mitocondrial, estrés oxidativo, temporada artificial y natural.

ABSTRACT

Bees are social insects of great economic and ecological interest, the decline of their population has been recorded during the last three decades. Within this group of insects there are three types of honey bees: Queen, workers and drones, they have different roles in a colony, being of greater interest in this study the evaluation of sperm of the drones pre and post cryopreservation for use in programs of artificial insemination (AI) of queen bees.

The objective of this work was to prepare two methods of evaluation of the sperm parameters that allow to select in a rigorous way groups of bees with better reproductive qualities. The conventional sperm parameters (mobility, membrane integrity and sperm concentration) were evaluated pre and post cryopreservation of the artificial and natural season from the seminal vesicles of 489 drones belonging to the Association of Agroecological Beekeepers "Abejas de Pichanaki". A positive correlation was recorded between conventional parameters and mitochondrial activity, $p < 0.05$ and a negative correlation between conventional parameters and levels of oxidative stress, $p > 0.05$ in both seasons. Spermatozoa showed differences post cryopreservation in mobility and membrane integrity ($p < 0.05$) but not in mitochondrial activity and oxidative stress. We report a significant difference of pre-cryopreserved samples between seasons in mobility, mitochondrial activity and level of oxidative stress ($p < 0.05$) but not in membrane integrity. It is concluded that it is possible to consider mitochondrial activity as a test to better characterize sperm quality.

Keywords: *Apis mellifera*, cryopreservation, mitochondrial activity, oxidative stress, artificial and natural season.

LISTA DE ABREVIATURAS

AAA-AP	Asociación de Apicultores Agroecológicos “Abejas de Pichanaki”
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGPI	Ácidos grasos polinsaturados
BSA	Seroalbúmina bovina
Ca ₂ ⁺	Calcio
CPA	Agentes crioprotectores
FVI	Fecundación <i>in vitro</i>
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogeno
Host + (%)	Reaccionados positivos para integridad de membrana
IA	Inseminación artificial
IUI	Inseminación intrauterina
ICSI	Inyección intracitoplasmática de un espermatozoide
m.s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
mL	mililitros
nm	nanómetros
NBT	Nitroblue de Tetrazolium
NBT + (%)	Reaccionados positivos para actividad mitocondrial
NO	Óxido Nítrico
MDA	Malondialdehido
MET%	Porcentaje de la movilidad espermática total
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
O ₂	Oxígeno
O ₂ ⁻	Ión superóxido
O ₃	Ozono

PBS	Buffer Fosfato salino
LPO	Peroxidación lipídica
rpm	Revoluciones por minuto
ROS	Espécies reactivas de oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
UV	Ultravioleta
µg	microgramos
µL	microlitros

I. INTRODUCCIÓN

La biotecnología reproductiva es un conjunto de técnicas orientadas al incremento de la eficiencia reproductiva de los animales (Palma, 2001) sin la necesidad de involucrar el genoma de la especie animal como la genética reproductiva, aunque están estrechamente relacionadas. Entre las técnicas biotecnológicas más utilizadas están la inseminación artificial, la inducción a la ovulación, la producción de embriones, así como el congelamiento de semen, pues son consideradas técnicas que permiten la sostenibilidad de la diversidad biológica, así como de su preservación (Palma, 2001). En la actualidad el empleo de estas tecnologías también permite el control poblacional de animales de alto valor económico (bovinos, caprino, porcino, ovino, etc.), siendo por año inseminadas cerca de 80 millones de hembras bovinas (Thibier, 1990), por lo que es importante orientar los sistemas de ciencia y tecnología hacia las necesidades de las poblaciones o sectores productivos, de modo que se facilite la viabilidad práctica de la innovación tecnológica y ética, evitando de esta manera los problemas que se pueden presentar en las especies de interés como el decrecimiento de la vida útil (Ugalde, 2014).

Durante muchos años la necesidad de conservar animales élite fue cubierta con técnicas complementarias, pero fundamentales con la criopreservación, una forma de congelamiento lento que tiene la capacidad de preservar a largo plazo y que es aplicable a una gran variedad de tipos celulares (Aliakbari et al., 2016). La vitrificación, por otro lado, es un método basado en el congelamiento ultra rápido, donde el agua pasa a un estado vítreo por un incremento extremo de la viscosidad presenciándose la solidificación a bajas temperaturas sin la formación de cristales y sin la necesidad de añadir plasma seminal o crioprotectores permeables (Dasi, 2016), por lo cual se considera que preserva adecuadamente la funcionalidad espermática con una alta motilidad, baja criocapacitación, elevado potencial de membrana mitocondrial, baja

fragmentación de DNA, la conservación acrosoma y una elevada integridad de membrana en comparación a la congelación convencional (Isachenko et al., 2012 ; Dasi, 2016), sin embargo el congelamiento lento es la metodología más extendida para la criopreservación de espermatozoides ya que permite la conservación de grandes volúmenes de muestras de semen, con resultados satisfactorios sobre la viabilidad y movilidad post criopreservación (Riva et al., 2016).

De acuerdo a la OMS, 2010 la determinación de la calidad espermática gira entorno a los resultados obtenidos luego de la evaluación de los parámetros espermáticos siendo estos la movilidad, integridad de membrana, viabilidad, concentración y morfología, quienes juegan un rol importante en el reconocimiento de la calidad reproductiva en distintas especies. Los reportes presentados hasta la actualidad muestran diversos fenómenos, ambientales tales como la exposición a ciertos productos químicos, metales pesados, pesticidas y calor, o radiación electromagnética que generan impactos a diferentes niveles de la estructura de los espermatozoides (Lähdetie, 1995; Thonneau et al., 1998; Słowikowska-Hilczer, 2006). Diferentes grupos de investigación afirman la cualidad de compuestos enzimáticos y no enzimáticos como los antioxidantes que mejoran la tolerancia al estrés oxidativo generado por dichos factores ambientales (Aliakbari et al., 2016).

Por ello, en los últimos años se vienen desarrollando diversas investigaciones que permiten detectar y cuantificar compuestos como las especies reactivas de oxígeno (ROS) que reducen la calidad espermática, tanto en especies animales como en humanos, para lo cual emplean quimioluminiscencia por luminol afín para la detección de ROS (Aitken et al., 1995; Agarwal A. et al., 2003). Aunque este método de medición de la frecuencia generacional de ROS es dinámico, es posible que no refleje con precisión el estado potencial de ROS.

Para tales evaluaciones, la cantidad de ROS detectada, en lugar de la generación de ROS representará una evaluación más fisiológica del estrés oxidativo, reacciones que

involucran el citocromo c-Fe³⁺ o Nitroblue de tetrazolium (NBT), complejos que miden ROS en la superficie de la membrana celular (Sikka, 1996). Este último método de detección, abarca quizá un mayor rango de ROS que afecta directamente a los espermatozoides, pues no solo detecta un producto final como es el malondialdehído (MDA) detectado mediante el ensayo de ácido tiobarbitúrico (TBA) luego de la peroxidación lipídica (LPO) (Sikka, 1996), sino que interacciona con todo el ROS que está diluido en el medio y es fácilmente detectable por la presencia de depósitos de formazán, compuestos reducidos del NBT.

En el presente trabajo se determinó la actividad mitocondrial de los espermatozoides de zángano, así como la cantidad de formazán generado en espermatozoides por cada colmena utilizando el proceso de óxido-reducción del NBT y lectura de éste reducido como dato relacionado a la calidad espermática.

II. MARCO TEÓRICO-CONCEPTUAL

2.1 Apicultura

La apicultura es considerada como el arte de recolectar, procesar colmenas deseadas, contenerlas en cajas, instalarlas en sitios apropiados, administrar científicamente un número óptimo de colmenas durante todo el año y aprovechar los beneficios directos e indirectos de las actividades (Veer & Jitender, 2017). Este sector representa una fuente de ingresos por los múltiples beneficios que pueden obtener los apicultores a través de la explotación artesanal o industrial (Salas, 2000; Adgaba et al., 2014). Entre los beneficios directos se encuentra la producción y comercialización de los productos apícolas que produce la abeja, tales como miel, cera, polen, propóleo, veneno de abeja (apitoxina) así como de jalea real (Santos et al., 2003). Mientras que en los beneficios indirectos se consiguen mediante la función polinizadora de las flores que realizan las abejas respecto a los cultivos, dando lugar a la generación *a posteriori* de frutos consumidos o utilizados mayoritariamente por los seres humanos (Santos et al., 2003).

En el ámbito mundial, la apicultura constituye una de las ramas de la agricultura más extensa a nivel geográfico, abarcando prácticamente todos los territorios que reúnen condiciones climáticas adecuadas para el desarrollo vital de las abejas (Santos et al., 2003 & Hung et al., 2018). Además, es una de las actividades económicas agropecuarias más sostenibles, sobre todo por el gran impacto positivo que tiene sobre la polinización de los cultivos. Sin embargo en el contexto nacional, la apicultura es realizada principalmente por pequeños apicultores, la gran mayoría posee menos de 10 colmenas, distribuidos en todas las regiones del país (Ministerio de Agricultura, 2011), concluyéndose en este reporte que es necesario tener en cuenta que para pequeños productores lo mejor es el trabajo asociativo pues permite compartir espacios de información, capacitación, la reducción de los costos de producción y búsqueda de mercado para los productos.

2.1.1. Abejas: *Apis mellífera*

Consideradas como una de las especies himenópteros eusociales junto a las avispa y las hormigas, forman parte de un grupo de insectos con una marcada división social de trabajo que permite la recolección y almacenamiento de alimentos que son consumidos por las abejas dentro de las colmenas, convirtiendo el polen y la miel almacenados en jalea real. La jalea real, así como otras secreciones glandulares son el alimento principal de las larvas en crecimiento y de la reina, pero también alimentan a otros miembros de la colonia como los zánganos (Wright et al., 2018).

En Biología llamamos casta a un grupo de individuos que se especializa en realizar una tarea específica. Esta diferencia inicia desde su capacidad reproductiva, impulsada por una señal ambiental definida, el consumo de jalea real; mientras las obreras son estériles, las reinas deben poner unos dos mil huevos por día, ambas cuentan con otras diferencias marcadas como la longevidad, el tamaño y el comportamiento (Mao W. et al., 2015). Por otro lado, los miembros masculinos de la colmena, tienen una anatomía y una resistencia diferentes al resto de las abejas, cuentan con cuerpos marcadamente robustos, aunque con una resistencia inferior a la de cualquier obrera, la existencia de éste está ligado a su capacidad reproductiva de lo contrario, son expulsados o eliminados durante el invierno (Mao et al., 2015).

La mayoría de las especies de abejas se han adaptado para alimentarse con una dieta herbívora de néctar floral y polen, considerando al néctar floral como su principal fuente de combustible para el vuelo, la termorregulación y producción de cera; por otro lado, el polen es su fuente nutricional de proteínas, grasas, esteroides y micronutrientes (Michener, 2000).

2.1.2 Factores ambientales y sus problemas en el campo de la reproducción

Las abejas melíferas son de especial interés debido a su actividad de polinización y su papel fundamental en la agricultura. Sin embargo, ha habido pérdidas dramáticas de colonias de abejas melíferas alrededor del mundo a raíz de la destrucción de su hábitat natural, parásitos o exposición a pesticidas (Gül et al., 2017) y a otros factores ambientales como metales pesados, calor o radiación electromagnética (Lähdetie, 1995; Thonneau et al., 1998; Słowikowska-Hilczek, 2006), afectando negativamente la calidad reproductiva de los zánganos, movilidad de los espermatozoides y su viabilidad, hasta una reducción de la calidad reproductiva de las reinas que se aparearon con zánganos expuestos a pesticidas (Fisher II & Rangel, 2018). Sin embargo, no es el único fenómeno que afecta a la calidad espermática, puesto que investigaciones recientes, demuestran que la senescencia es un factor del cual los zánganos no se escapan, afectando su capacidad de aparearse y de entregar los espermatozoides con éxito debido a la deficiencia morfológica a la cual llegan pasado los 30 días de vida, reducción en el tamaño de la cabeza y de las alas (Metz & Tarpy, 2019). Estos cambios no suelen ser cambios únicamente morfológicos, sino también resultan en variaciones fisiológicas por la acción de parásitos en combinación con compuestos químicos, poniendo en peligro el éxito del apareamiento, confirmándose al mismo tiempo que las funciones reproductivas de los zánganos son muy sensibles a los factores de estrés (Kairo et al., 2017).

2. 2. Espermatogénesis y el espermatozoide

El espermatozoide es la célula germinal masculina producida luego de un permanente proceso de división de las espermatogonias en las gónadas llamado espermatogénesis por la cual de cada espermatogonia se llega a producir cuatro espermatocitos haploides que permanecen unidos entre sí por puentes citoplasmáticos y en comunicación con células alimentadoras o de Sertoli, también encargadas de inducir la metamorfosis a espermatozoide (Oliver et al., 2006), sin embargo, el proceso es algo diferente en espermatozoides de zángano, en donde su tipo de reproducción es haplodiplóica, hembra diploide producidas por huevos fertilizados que se generan a través de la meiosis (divisiones de maduración reductiva) como en otros animales, mientras que la división durante la espermatogénesis se altera en los machos haploides ya que la producción de espermatozoides haploides se da por una división no reductiva (Sekiné, et al., 2015). Frente a este proceso tan particular se ha descrito tres sistemas de cómo se llevan a cabo la espermatogénesis en los zánganos, el primero propone una primera división sin reducción cromosómica resultando la eliminación de una célula enucleada que termina degenerándose y dándose una segunda división equitativa del material genético pero desigual del citoplasma resultando en la degradación de la célula más pequeña y en la transformación de la más grande en un espermatozoide. El segundo sistema propone una primera división sin reducción cromosómica resultando la eliminación de una célula enucleada que termina degenerándose y dando una segunda división totalmente ecuacional, resultando dos espermatozoides. El tercer sistema propone una primera división meiótica donde las cromátides hermanas producen espermatocitos idénticos, en la segunda división las cromátides se distribuye únicamente a una de las dos células hijas resultando en la eliminación de dos células enucleadas y la generación de dos espermatozoides (Carabajal et al., 2017).

Seguiriéndose cualquiera de los tres sistemas, el producto final resulta ser un espermatozoide de zángano que cuentan con una longitud de entre 250-270 μm (Lino-Neto et al., 2000), una cabeza que consiste en un acrosoma anterior y el núcleo, que tiene 5 μm de largo, 0.5 μm de ancho y 0.3 μm de grosor (Lensky et al., 1979). Como en otras especies de insectos, la cola de la abeja espermatozoide contiene dos derivados o subunidades mitocondriales que se extienden desde la base del núcleo hasta el final de la cola (Rothschild, 1955).

2.2.1. Evaluación del estado de los espermatozoides

Es el análisis espermático útil para evaluar la calidad de los espermatozoides y por ende la funcionalidad del semental como reproductor, en el caso de los humanos son empleados para la caracterización de la fertilidad y en el caso de animales por su interés en el mejoramiento genético en las distintas industrias ganaderas (bovinos, ovinos, porcinos, etc.). Por ello se evalúan los siguientes parámetros:

2.2.1.1 Parámetros espermáticos convencionales

- **Movilidad**

Los espermatozoides con capacidad de moverse logran la fecundación, por lo cual éste es un parámetro habitual para evaluar una muestra seminal, indica el estado energético de los espermatozoides (Ciereszko et al., 2017). La OMS ha establecido un valor de 40% de espermatozoides móviles en el caso del hombre para considerar la muestra dentro de los parámetros normales. En abejas, se ha mostrado una fuerte correlación entre la movilidad espermática y el rendimiento de los espermatozoides en reinas inseminadas (Wegener et al., 2012). Encontrándose valores de 69 % a 79% para este parámetro (Ciereszko et al., 2017).

- **Concentración**

La cantidad de espermatozoides presentes en el semen por eyaculado se relaciona con la concentración de espermatozoides que nos permite predecir la concepción. Para evaluar la concentración de espermatozoides se sigue el criterio establecido por la OMS, el cual indica que una concentración adecuada es mayor a 15×10^6 de espermatozoides/mL (WHO, 2010), para el caso de humanos. Con respecto a la concentración en zánganos los valores han sido variables, obteniéndose $2.2\text{--}3.4 \times 10^6/\mu\text{L}$ de espermatozoides en semen (Ben Abdelkader et al., 2014), $3.33 \times 10^6/\mu\text{L}$ de espermatozoides en semen (Rhodes et al., 2010) e incluso valores más altos como 11.9×10^6 espermatozoides (Schlūs et al., 2003). Estas variaciones se pueden deber a los diferentes métodos de recolección de cada estudio y a su madurez sexual.

- **Viabilidad**

La evaluación de la viabilidad espermática está relacionada a la capacidad de un espermatozoide para poder fecundar. Además, la viabilidad espermática es importante para determinar el éxito reproductivo en especies sexualmente promiscuas (Hunter & Birkhead, 2002). En humanos se establece que la viabilidad mínima normal es de 58%. Se han registrado valores de viabilidad mayores al 80 % en ratones (Zahmatkesh et al., 2014). Algunos estudios en *Apis mellifera*, han indicado que vitalidades del 60 – 80% indicaban mayor probabilidad de fecundación (Maalaps, 2014).

- **Integridad de la membrana**

Este parámetro se encuentra relacionado a la viabilidad espermática ya que refleja la funcionalidad de la membrana, y es especialmente útil para evaluar la competencia de espermatozoides en insectos como las abejas (Tofilski et al.,

2012). Se ha encontrado para *Apis mellifera* valores de 95% a 99% de integridad de membrana (Ciereszko et al., 2017).

2.2.1.2 Parámetros espermáticos no convencionales

- **Actividad Mitocondrial**

La actividad de la mitocondria está relacionado a las funciones básicas de la célula principalmente por su característica en generación de energía durante el movimiento de los espermatozoides. Por esta razón es que se ha reportado una correlación con la movilidad en vertebrados (Espinoza et al., 2009; Paoli et al., 2011).

- **Estrés Oxidativo**

El estrés oxidativo es un efecto secundario del desequilibrio de las especies reactivas de oxígeno. Los espermatozoides son susceptibles al estrés oxidativo durante su preparación y selección, por lo cual se considera una de las causas del bajo porcentaje de las tasas de fecundación (Du Plessis et al., 2008), afectando principalmente los parámetros de movilidad (Agarwal et al., 2003).

2.2.2. Actividad mitocondrial en espermatozoides

La mitocondria es un orgánulo semiautónomo y dinámico, está regulada por una serie de proteínas que determinan la forma de la organela, capaces de adaptarse a diferentes estímulos de estrés (Gómez, 2016). Su función dentro de las células eucariotas consiste en la oxidación continua de sustratos y mantener el gradiente de protones donde se generan un gran potencial de membrana, el cual es un parámetro vital para la valoración del estado funcional de la mitocondria, su fisiología, su viabilidad así como del potencial de fertilización de un espermatozoide (Zhao et al., 2015) otras funciones con las que también cuenta esta maquinaria es la del almacenamiento de iones de calcio o la

regulación de la apoptosis (Gómez, 2016). Este mecanismo de generación de energía en forma de ATP se ve reflejado en la movilidad espermática, cualidad particularmente demandante en sí mismo de grandes cantidades de energía que es producida a través de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Pfeiffer et al., 2001), evento que se produce dentro de la cadena transportadora de electrones considerado a su vez como el principal mecanismo productor de especies reactivas de oxígeno (Kothari et al., 2010 & Gómez, 2016). En condiciones óptimas, las mitocondrias proporcionan la energía necesaria para el movimiento espermático, sin embargo, en condiciones de disfuncionalidad mitocondrial se da lugar a patologías como una movilidad reducida de los espermatozoides (Silveira, 2016).

2.3 Criopreservación de espermatozoides

Es una técnica utilizada con la finalidad de la preservación a largo plazo de los espermatozoides para su posterior uso en técnicas de baja complejidad como la inseminación intrauterina (IIU) o de técnicas de alta complejidad como la fecundación *in vitro* (FIV) y la inyección intracitoplasmática de un espermatozoide (ICSI). La criopreservación está basada en un congelamiento termocontrolado de la célula y tejidos utilizando nitrógeno líquido con la intención de conservar la viabilidad de las especies (Ponce de León, 2014).

Para lograr la estabilidad y resistencia de las células a las bajas tasas de temperatura, son empleados compuestos químicos llamados crioprotectores, diluyentes que protegen del daño producido por la formación de cristales de hielo durante el proceso de congelamiento y descongelamiento. Estos componentes son dependientes de las diferentes características fisicoquímicas de las células, como la permeabilidad de membrana, concentración y tiempo de exposición, valores particulares para cada especie (Renard & Cochard, 1989), considerándose entonces que la composición de

dichos diluyentes juegan un papel crucial en el congelamiento lento y rápido reduciendo el estrés derivado de los protocolos de congelamiento y descongelamiento siendo de mucha importancia la comprensión del uso de los crioprotectores y de su naturaleza (Yeste, 2016).

2.3.1. Crioprotectores penetrantes y no penetrantes

Los agentes crioprotectores (CPA) penetrantes son compuestos con la capacidad de ingresar a las células, reduciendo la concentración de electrolitos y aumentando su resistencia a bajas temperaturas. El mecanismo con las que actúan estos compuestos es aumentando la viscosidad del citoplasma, variando las tasas de difusión de las moléculas de agua y alterando las propiedades lipídicas de la membrana (Mazur, 1984), sin embargo estas sustancias pueden generar un daño durante el congelamiento, si no ingresan rápidamente antes de congelarse y durante el descongelamiento, si estas no se eliminan rápidamente después del descongelamiento (Gao et al., 1995), por lo que se consideran de real importancia las concentraciones de las sustancias para evitar la citotoxicidad (Rosato & Iaffaldano, 2013), por otro lado la eficiencia de estas sustancias se ve potenciada con CPA no penetrantes (Yeste, 2016).

Los CPA no penetrantes son proteínas que se encuentran en la leche, yema de huevo y azúcares de gran peso molecular que ayudan a prevenir la formación de cristales de hielo y estabilizan las proteínas de membrana, debido al tamaño de las moléculas, estas no pueden atravesar la membrana por lo que cumple un rol extracelular siendo un apoyo fundamental en la disminución de la concentración de CPA penetrantes (Fahy, 1986). Se consideran como principal CPA no penetrantes a los disacáridos frente a los monosacáridos y a los lípidos de baja densidad provenientes de la yema de huevo, pues esta otorga mayor protección que la fracción entera de yema de huevo (Fraser et al., 2007).

2.3.2. Antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos

Los espermatozoides portan una maquinaria de antioxidantes para contrarrestar los efectos tóxicos de las ROS, dicha maquinaria posee la función de actuar como donadores de electrones evitando la cadena de óxido-reducción (Hicks et al., 2006). La actividad de los antioxidantes presentes en el plasma seminal cuenta con una cantidad y capacidad suficiente para prevenir daños a los espermatozoides generados por los leucocitos en condiciones normales (Sikka, 1996), aunque es limitada la capacidad antioxidante a nivel del citoplasma (Gray et al., 2013). El principal sistema de enzimas antioxidantes en el semen es conocido como la triada enzimática que comprende al superóxido dismutasa (SOD), catalasa y glutatión peroxidasa - reductasa (Walczak-Jedrzejowska et al., 2013).

El SOD dismuta espontáneamente los iones superóxidos (O_2^-) formando oxígeno (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mientras que la catalasa convierte el H_2O_2 en oxígeno molecular (O_2) y agua (H_2O) (Sikka, 1996). El glutatión peroxidasa, que contiene selenio con glutatión como donador de electrones, se encarga de eliminar los radicales peróxido de los peróxidos, incluido el H_2O_2 , mantenimiento de la motilidad de los espermatozoides, mientras que el glutatión reductasa cataliza la reducción del glutatión oxidado a glutatión reducido el cual será utilizado por la glutatión peroxidasa para la reducción del peróxido y de lipoperóxidos, los cuales son especies reactivas del oxígeno, por lo tanto el glutatión peroxidasa como el glutatión reductasa pueden actuar directamente con las enzimas involucradas en la inhibición de la peroxidación lipídica de los espermatozoides (Sikka, 1996).

Los mecanismos antioxidantes se encuentran ubicados principalmente en la matriz mitocondrial por su importancia en el mantenimiento de la motilidad espermática, la tasa de hiperactivación y la capacidad de los espermatozoides de experimentar una reacción acrosómica durante las técnicas de preparación espermática, especialmente en

ausencia de plasma seminal, además se ha descrito su rol de protección del DNA espermático del daño oxidativo y en el proceso de condensación de la cromatina (Pfeifer et al., 2001).

También fueron descritos otros componentes antioxidantes de naturaleza no enzimáticos conocidos como carotenoides que cumplen de igual forma la función de evitar alteraciones de moléculas biológicas funcionalmente vitales con el objetivo de mantener el equilibrio oxidante/antioxidante a favor de estos últimos. Los carotenoides son antioxidantes naturales, responsables de la integridad de las membranas celulares además de la proliferación de las células epiteliales y la regulación de la espermatogénesis. Su deficiencia en la dieta puede conducir a una reducción en la motilidad de los espermatozoides (Hogarth & Griswold, 2010).

Tanto las vitaminas E y C pueden proteger a los espermatozoides contra el daño oxidativo endógeno del DNA, así como del daño a la membrana celular, reconociendo su efecto significativo en la mejora de los parámetros espermáticos (Sikka, 1996). La vitamina E (α -tocoferol) cuenta con una actividad antioxidante que se basa principalmente en la reducción de la peroxidación lipídica iniciada por los ROS, además de la captura de los radicales hidroxilos libres como de los radicales superóxido, protegiendo a los componentes de la membrana celular espermática del daño y, en menor medida, se indica que disminuye la producción de los ROS. Existen reportes que señalan una mejora significativa de la movilidad espermática luego de la administración oral reduciendo la producción de malondialdehído en los espermatozoides, que resulta ser el producto final de la peroxidación lipídica, y, por tanto, un indicador indirecto de la intensidad del daño en los diferentes procesos celulares (Suleiman et al., 1996). Por otro lado, la vitamina C (ácido ascórbico) es una sustancia soluble en agua cuya concentración en el plasma seminal es aproximadamente 10 veces mayor que en el suero sanguíneo cumpliendo la función de protección contra la pérdida de movilidad de

los espermatozoides y el daño del DNA frente a factores ambientales (Esteves et al., 1998).

Ernster en 1993 menciona que la albumina empleada en los procedimientos de lavado de espermatozoides o capacitación espermática, probablemente sirva como un antioxidante al proporcionar grupos tiol (-SH) necesarios para la actividad antioxidante en la “ruptura de cadena”.

2.3.3. Efecto de la criopreservación en la viabilidad espermática

La estructura de la membrana plasmática en los espermatozoides se caracteriza por una composición lipídica particular frente a la membrana de otras especies celulares; su contenido en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) es considerado cientos de veces mayor, además de que poseen grandes cantidades de fosfolípidos diPUFA (esterificados con dos AGPI), que es muy poco común, excepto en los espermatozoides, la retina y algunas áreas del cerebro. Esta particular composición se ha relacionado con sus funciones específicas, ya que promueve la creación de microdominios con diferentes características de fluidez, fusogénesis y permeabilidad necesarios para alcanzar el ovocito y fusionarse con él (Beirão et al., 2012).

Durante la criopreservación, los espermatozoides sufren diferentes niveles de estrés, como cambios en el equilibrio osmótico, así como de cambios en la temperatura durante el enfriamiento, el congelamiento y el recalentamiento (Rosato & Iaffaldano, 2013). Estos cambios conducen a la formación de cristales de hielo, que se encuentran entre los principales factores biofísicos que causan la muerte de los espermatozoides (Holt, 2000). Los agentes crioprotectores penetrantes (CPA) encargados de permeabilizar la membrana, aumentan la fluidez de ésta e inducen una pérdida parcial de moléculas de agua en la célula, generando una reducción en el punto de congelación, así como en el

número y tamaño de cristales de hielo formados dentro de la célula (Rosato & Iaffaldano, 2013).

A su vez, se registran cambios en la membrana plasmática del espermatozoide durante la criopreservación como la transición de fase lipídica, expresada en la reagregación de proteínas de membrana y fusión irreversible de esta (Yeste, 2016). Las variaciones en la composición lipídica de la membrana plasmática se han relacionado con una disminución en la calidad espermática durante la criopreservación (Beirao et al., 2012), debido a una singularidad entre las funciones de los crioprotectores por su carácter protector frente al daño osmótico y su capacidad de inducir toxicidad dependiente de la concentración y tiempo de exposición a este (Rosato & Iaffaldano, 2013).

2.4 Radicales libres

La oxidación es un proceso bioquímico fundamentado en la pérdida de electrones y a su vez relacionado a otro proceso de captación conocido como reducción, ambos importantes para el desarrollo biológico, debido a que participan en los mecanismos de generación de energía celular (Nuñez, 2011). Cuando este proceso se da en exceso, surge el fenómeno conocido como estrés oxidativo, considerado como el desequilibrio en los ROS y los antioxidantes, derivando en un daño celular (Elejalde, 2001). Los radicales libres cuentan con un electrón desapareado en su último nivel y son consideradas como moléculas altamente reactivas, pudiendo causar un daño por lograr su estabilidad (Mallok et al., 2011). Los ROS se generan de forma continua en los organismos, como producto de normal metabolismo celular y en algunas ocasiones por la exposición a factores exógenos (Baumber et al., 2003).

De acuerdo a algunos expertos, los ROS tienen una tendencia hacia la reacción en cadena; es decir, un compuesto que lleva un electrón desapareado reaccionara con otro compuesto para generar un electrón desapareado, de tal manera que el radical engendra radical. Por lo tanto, el problema básico es romper esta reacción en cadena mediante la formación de productos finales no radicales (Agarwal et al., 2003). Hay al menos dos mecanismos de su producción, La primera es a nivel de la membrana celular, y la segunda es a nivel de las mitocondrias, que filtran electrones de la cadena respiratoria (Hicks et al., 2006). También se descubrió que la producción del anión superóxido está implicado en oxidación de los productos generados por la actividad de NaDH oxidorreductasa, una enzima localizada en la región central de la cabeza de los espermatozoides que se encuentra en estrecha relación con la cadena mitocondrial y la xantina oxidasa presente tanto en el espermatozoide como en el plasma seminal (Fraczek & Kurpysz, 2005).

En el semen, la principal fuente celular de ROS son las células espermáticas inmaduras además de los glóbulos blancos. El aumento en el número de leucocitos puede deberse a infección e inflamación, pero también puede ser secundario a factores ambientales nocivos, abstinencia sexual prolongada o varicocele (Saleh et al., 2002) aumentando la toxicidad inducida por óxido nítrico mediado indirectamente a través de su interacción con aniones superóxido y formación de anión peroxinitrito (Sikka, 1996).

La segunda fuente de ROS en el semen son los leucocitos que, bajo condiciones fisiológicas, producen hasta 1.000 veces más ROS que los espermatozoides, esta alta producción de ROS por leucocitos desempeña un rol notable en la defensa celular frente infecciones e inflamación puesto que los leucocitos activados se infiltran en el órgano afectado y secretan grandes cantidades de ROS que conducen a la eliminación de agentes infecciosos (Plante et al., 1994).

El daño causado por los ROS a las células es registrado a nivel de lípidos, DNA, proteínas y carbohidratos (Venereo, 2002). La peroxidación lipídica es el daño producido a nivel lipídico que afecta a la membrana celular, contenedora de una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, produciéndose la apoptosis celular (Jerlik et al., 2000).

La membrana celular es sensible al daño oxidativo causado por los ROS (Cadenas, 1997). Los principios que participan con más frecuencia en la peroxidación lipídica son la naturaleza y cuantitativa de los compuestos peroxidantes, la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, su presencia y la activación de enzimas que limitan o anulan el proceso de la enzima glutatión peroxidasa entre otros (Venereo, 2002). Por otro lado, dentro de las proteínas se ven afectados grupos de aminoácidos, las interacciones de cadenas peptídicas, así como la formación de grupos carbonilos (Cárdenas & Pedraza, 2006). Se reportan efectos negativos en el DNA como mutaciones, ausencia de la expresión o transcripción, deleciones y modificaciones oxidativas de las bases que alteran la correcta expresión de la información y funcionamiento celular (Cardenas & Pedraza, 2006). Los hidratos de carbono como la glucosa, así como otros monosacáridos sufren peroxidación, una vez activadas pueden reaccionar con otras conformando nuevas interacciones moleculares perjudiciales en el metabolismo celular (Blokina et al., 2003).

2.4.1 Estrés oxidativo – Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica (LPO) es considerada como la principal consecuencia del estrés oxidativo y principalmente estudiada por el aumento de la activación de oxígeno en los sistemas biológicos; la peroxidación lipídica es de gran interés en la comprensión de la reducción de la calidad espermática en especies importantes (Zahmatkesh et al., 2014). Los tipos más comunes de LPO son: la LPO no enzimática, y la LPO enzimática (dependiente de ADP y NADPH) (Sikka, 1996). El monitoreo de la oxidación de los

lípidos puede realizarse a través de diferentes procedimientos: como la susceptibilidad a la oxidación y cuantificación de dienos conjugados, permitiendo el monitoreo continuo de la peroxidación de los lípidos en las lipoproteínas y biomembranas y otras muestras biológicas; cuando se añade al sistema generadores de radicales libres (oxidantes) como por quimioluminiscencia, en donde el oxígeno singulete es una especie quimio luminiscente importante en la peroxidación lipídica de los sistemas biológicos (Céspedes M. & Castillo H., 2008) y por la formación y cuantificación de productos de oxidación como el malondialdehído (MDA) ensayados por la reacción del ácido tiobarbitúrico (TBA) in vitro e in vivo (Sikka, 1996).

El efecto más significativo de LPO es la perturbación de la membrana como del mantenimiento del gradientes de iones y metabolitos además de la presencia de bajos niveles de NADH y glutatión, como resultado del aumento de la actividad de glutatión peroxidasa para eliminar metabolitos de LPO, afectando aún más la homeostasis del Ca^{+2} celular (Sikka, 1996); fue reportado a su vez que la LPO puede dañar el DNA y las proteínas, ya sea por oxidación de bases de DNA (principalmente guanina a través de lípidos peroxilo o radicales alcoxilo) o mediante unión covalente a MDA, lo que produce roturas de cadena y enlaces cruzados (Céspedes & Castillo, 2008).

Se ha descrito también que el aumento de la tasa de LPO está relacionada con la madurez incompleta de los espermatozoides; por lo tanto, es un defecto innato en vez de adquirido de los espermatozoides (Huszar & Vigue, 1994).

2.5 Criocapacitación: Capacitación inducida por el proceso de criopreservación

La criopreservación es una técnica de gran importancia para la conservación del material genético, aunque con una reducción en la viabilidad de las células (Watson, 1995) debido a todos los eventos antes mencionados, lo cual conlleva a que los espermatozoides post criopreservación presenten daño a nivel de la membrana plasmática o mitocondrial. Algunas especies animales muestran signos de un proceso de capacitación prematura asociada con la criopreservación demostrándose esto a través del incremento de la fosforilación de ciertas proteínas en residuos de tirosina de estos espermatozoides criopreservados cuyo patrón de expresión de estas fosforilaciones es casi similar comparado con los patrones obtenidos en una capacitación *in vitro* con espermatozoides frescos (Bedford S. et al., 2000; Pommer et al., 2003). Aún no se conoce la causa de la criocapacitación, sin embargo, se planteó que este evento puede deberse a un incremento en los niveles de calcio intracelular durante la criopreservación (Bailey & Berube, 1998). Estos eventos muestran un proceso de capacitación inducida por la técnica de congelamiento llamada criocapacitación que da como resultado una alteración de la membrana fosfolipídica similar en la primera indicando que parte de la reacción acrosomal ha comenzado muy temprano en espermatozoides criopreservados (Buhr et al., 1994).

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVO

3.1 Hipótesis

3.1.1 Hipótesis nula (H0)

H0: No existe una correlación entre los índices de actividad mitocondrial y la supervivencia de espermatozoides de zángano pre y post criopreservación.

3.1.2 Hipótesis Alternativa (H1)

H1: Existe una correlación entre los índices de actividad mitocondrial con la supervivencia de espermatozoides de zángano pre y post criopreservación.

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo general

Evaluar la actividad mitocondrial como parámetro de calidad espermática pre y post criopreservación en *Apis mellifera* de Pichanaki, Junín.

3.2.2 Objetivos específicos

1. Estandarizar un protocolo para la evaluación y determinación de la actividad mitocondrial de muestras espermáticas de abejas pre y post criopreservación.
2. Acondicionar un ensayo de detección bioquímica para la evaluación del estrés oxidativo pre y post criopreservación.
3. Determinar la correlación entre la viabilidad y la actividad mitocondrial en espermatozoides de abeja pre y post criopreservación.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales

4.1.1 Material biológico

Los zánganos de *Apis mellifera*, fueron colectados del departamento de Junín, distrito de Pichanaki, de un total de 19 apiarios de la Asociación de Apicultores Agroecológicos “Abejas de Pichanaki” (AAA-AP), fueron agrupados en dos temporadas (Artificial, 169 zánganos producidos en el mes de diciembre y Natural, 320 zánganos producidos en el mes de octubre) y transportados en pequeños contenedores (Figura 1) codificados de la siguiente manera: 1-18-PICHANAKI (Col. 1.A); 2-18-PERENE (Col. 2.A); 3-18-PICHANAKI (Col. 3.A); 4-17- PICHANAKI (Col. 4.A); 5-18-PICHANAKI (Col. 5.A), 6-18-PICHANAKI (Col. 6.A), 7-18-PICHANAKI (Col. 7.A), 8-18-PICHANAKI (Col. 8.A), 9-18-PERENE (Col. 9.A) y 10-18- PICHANAKI (Col. 10.A) todos pertenecientes a la temporada de generación artificial y trabajados en un pool (Anexo 1), mientras que las colmenas con códigos: Colmena 31 (Col. 1.N); Colmena 9 (Col. 2.N); Colmena 21 (Col. 3.N); Colmena 25 (Col. 4.N); Colmena 40 (Col. 5.N); Colmena 6 (Col. 6.N); Colmena 35 (Col. 7.N); Colmena 12 (Col. 8.N); Colmena 1 (Col. 9.N) y Colmena 20 (Col. 10.N) pertenecientes a la temporada de generación natural de zánganos (Anexo 1), fueron divididos en 4 subgrupos por colmena, considerando al cuarto subgrupo de cada colmena un pool, los apiarios de la AAA-AP están ubicados en pisos altitudinales de entre 525 m.s.n.m a 1100 m.s.n.m (Anexo 1).

4.1.2 Insumos químicos

Se utilizó medio HAM F-10 (N6635-10L SIGMA), Penicilina (P3032-MU), Estreptomicina (S9137-100G), Lactato de calcio (L4388-50G), Bicarbonato de sodio (S5761-500G), preparación del crioprotector en base de DMSO (D137510-1L SIGMA), solución hiposmótica, seroalbúmina bovina BSA fraction V (A7030-10G SIGMA), Solución Nitroblue de tetrazolium (N6876-100MG SIGMA), agua ultrapura de calidad Milli-Q®, CO₂, etanol absoluto (1.00983.1011-1L Merck) y nitrógeno líquido.



Figura 1. Jaulas para el transporte de zánganos y obreras.

4.1.3 Equipos y materiales de laboratorio

- Cabina de flujo laminar, tanque de nitrógeno líquido, refrigeradora (4 y -20 grados centígrados), agitador vortex, espectrofotómetro (Modelo UNICO; Serie 2100/2100UV), microscopio electrónico, incubadora de CO₂, plancha termocontrolada, computadora, equipo de criopreservación CL 3300® (Figura 2), centrifuga refrigerada, sonicador (MISONIX®), autoclave, sistema de purificación de agua.



Figura 2. Equipo de criopreservación CL 3300®.

- Pipetas mecánicas, tips, tubos de 1.5 mL, tubos Falcon de 15mL y 50mL, filtros de membrana de 0.22 μm (tamaño de los poros), capilares de hematocrito, sin heparina, placas petri, critoseal, pinzas, tijeras, alfileres, hojas de bisturí, papel Kraft, planchas de tecnopor.

4.2 Métodos

4.2.1 Evaluación de espermatozoides pre criopreservación

4.2.1.1 Preparación del medio de nutrición HAM F-10 (Anexo 2)

El medio fue preparado de acuerdo al anexo 2, se diluyó 9.8 g del mix de nutriente HAM F-10 en polvo con L-glutamina, libre de bicarbonato de sodio por cada litro de agua ultrapura a calidad Milli-Q®, se suplementó con 2.1 g de bicarbonato de sodio, 0.075 g de penicilina, 0.075 g de estreptomicina y 0.245 g de lactato de calcio, se mezcló lentamente y se almacenó a 4°C hasta su utilización.

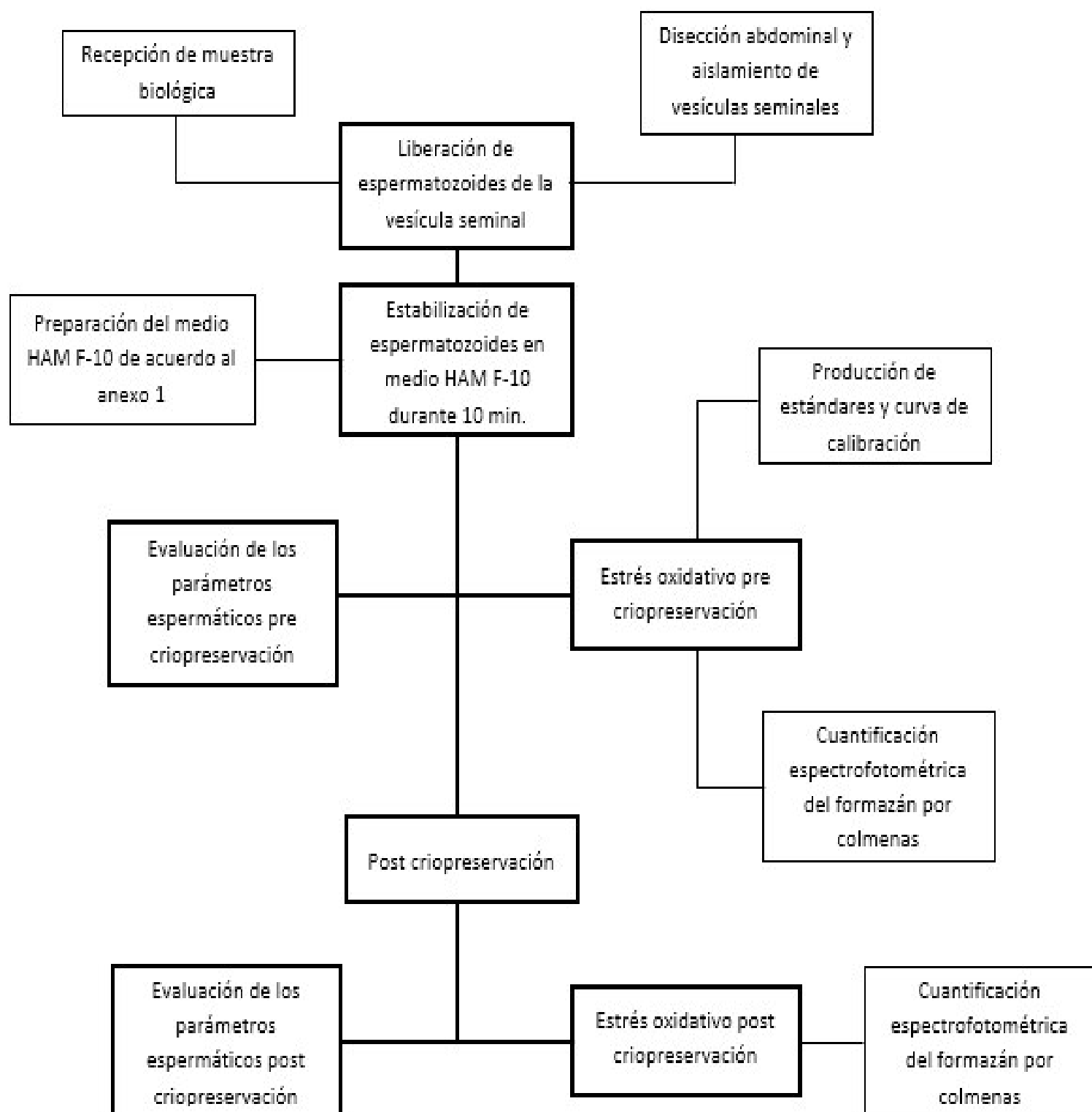


Figura 3. Flujograma de trabajo para la evaluación de la calidad espermática pre y post criopreservación.

4.2.1.2 Obtención y preparación de los espermatozoides para la evaluación pre criopreservación

Las vesículas seminales fueron recuperadas, así como lo describe (Valdivia & Temoche, 2016). La posición de las vesículas seminales fue determinada en relación a la ubicación de las glándulas de la mucosa, estructuras blancas que ocupan hasta un 10-15% del espacio abdominal, las vesículas seminales poseen un patrón de coloración que va desde un blanco translucido hasta un beige oscuro dependiente del nivel de madurez sexual de cada zángano (Figura 4).

Cada par de vesículas seminal fue homogeneizada en 25uL de medio HAM F-10 suplementada con BSA al 0.4% (Bermúdez et al., 2006). Se considera como unidad analítica al pool de homogeneizado proveniente de cinco zánganos por considerarse una muestra representativa (Bermúdez et. al., 2006). Luego del homogeneizado se estabilizó durante 10 minutos a 37°C en una incubadora de CO₂, transcurrido el tiempo de estabilización, la muestra se observó al microscopio de campo claro registrando la movilidad de los espermatozoides, determinando los porcentajes de movilidad progresiva, no progresiva e inmóvil de 200 espermatozoides por cada colmena. La integridad de membrana fue evaluada empleando una solución hiposmótica en la que se incubó durante 30 minutos, se determinó el porcentaje con la visualización de 100 espermatozoides por cada colmena.

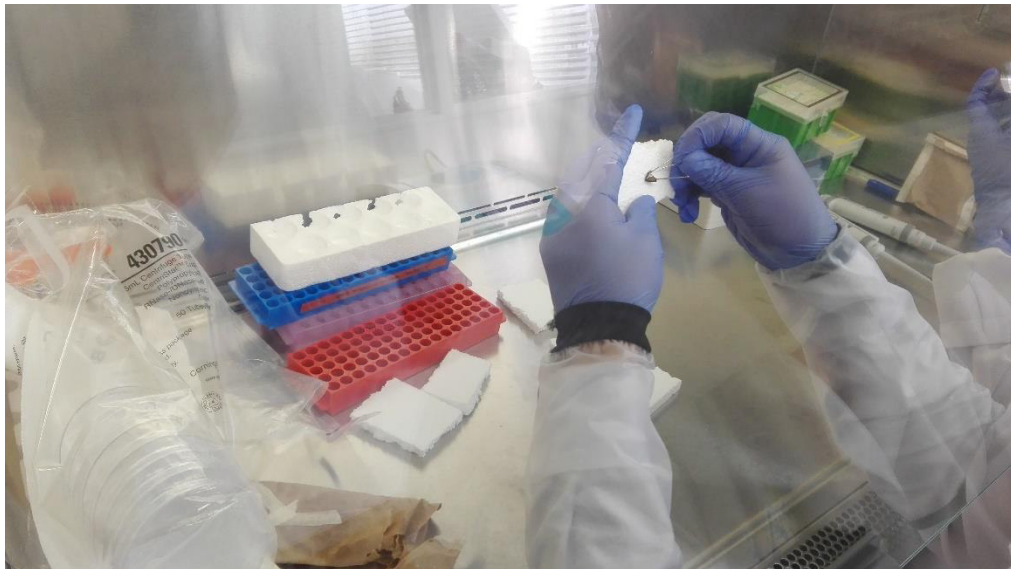


Figura 4. Disección de zánganos en cámara de flujo laminar.

4.2.2 Evaluación de la actividad mitocondrial y estrés oxidativo

4.2.2.1 Ensayo bioquímico con peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

4.2.2.1.1 Obtención de sales de formazán

Para la obtención de sales de formazán es necesario la reducción del nitroblue de tetrazolium (NBT) con compuestos reductores como la acción de aniones superóxido generados por el sistema santonina oxidasa (Tunc et al., 2010). En el laboratorio de Fisiología de la Reproducción las sales de formazán fueron producidas a partir de la solución de NBT interactuando ésta con diferentes radicales libres que se generen luego de la mezcla con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y la exposición final a radiación ultravioleta (UV) durante 30 a 40 minutos en tubos de microcentrífuga 1.5mL de pesos conocidos como “peso a”.

El formazán generado fue recuperado por centrifugación durante 15 minutos a 15000 RPM, el sobrenadante fue retirado y el pellet fue resuspendido con PBS 1X, posteriormente centrifugado durante 15 minutos a 15000 RPM. El

sobrenadante fue descartado y el pellet fue disuelto en agua Milli-Q, nuevamente centrifugado y descartado el sobrenadante. El pellet fue secado, pesado “peso b” y almacenado hasta su resuspensión en etanol absoluto para la construcción de la curva estándar de formazán (masa vs absorbancia). La Figura 5 resume el proceso de generación de sales de formazán.



Figura 5. Reducción del nitroblue de tetrazolium a cristales de formazán.

4.2.2.1.1 Producción de estándares

Fue recuperada la mayor cantidad de sales de formazán en 1mL de etanol absoluto, las trazas no resuspendidas fueron secadas dentro de los mismos tubos de microcentrífuga y nuevamente pesadas para definir el peso de las sales no resuspendidas “peso c”. La diferencia entre el “peso b” y el “peso c” indica el peso de sales de formazán resuspendidas “peso d”.

El stock producido por la dilución del “peso d” conformado por cristales de formazán en 1mL de etanol absoluto fue diluido secuencialmente hasta



Figura 6. Producción de estándares. Se muestra las diluciones sucesivas del formazán en etanol absoluto. La concentración de formazán incrementa de derecha a izquierda.

obtener diferentes concentraciones definidas. Se completó cada dilución hasta los 2mL como se observa en la Figura 6 y fueron leídas con el espectrofotómetro.

4.2.2.1.2 Curva de calibración del formazán

Los estándares fueron leídos con un espectrofotómetro (Modelo UNICO; Serie 2100/2100UV) a una longitud de onda de luz ultravioleta de 570 nm (Tvrdà et al., 2016). Se obtuvo una curva de calibración a partir de diferentes concentraciones, mientras que los valores de absorbancia son registrados en la tabla 1 (Figura 11).

4.2.2.2 Actividad mitocondrial de espermatozoides obtenidos de vesículas seminales (Homogeneizado).

Una gota de 10µL del homogeneizado de espermatozoides fue mezclada con 10µL de NBT 1X sobre un portaobjetos pre-calentado a 37°C en una platina térmica, la mezcla fue cubierta con una laminilla previamente acondicionada para que ésta no toque la superficie de la lámina, formándose una columna líquida entre el portaobjeto y cubre-objeto (sistema de óxido reducción) y otra lámina en la que la gota de 10 µL no es mezclada con NBT, considerada como el control. El sistema de óxido reducción fue colocado en una cámara anaeróbica durante 45 minutos a 37°C. Los sistemas fueron evaluados al microscopio con el objetivo de aceite de inmersión 100X, la actividad mitocondrial fue determinada de acuerdo a la clasificación siguiente: R: reaccionados y N.R: no reaccionados. Se analizaron 100 espermatozoides en cada muestra y los valores fueron expresados en porcentajes de acuerdo a

Hrudka (1979). En la Figura 7 se resume el proceso de preparación del sistema de óxido reducción en lámina.

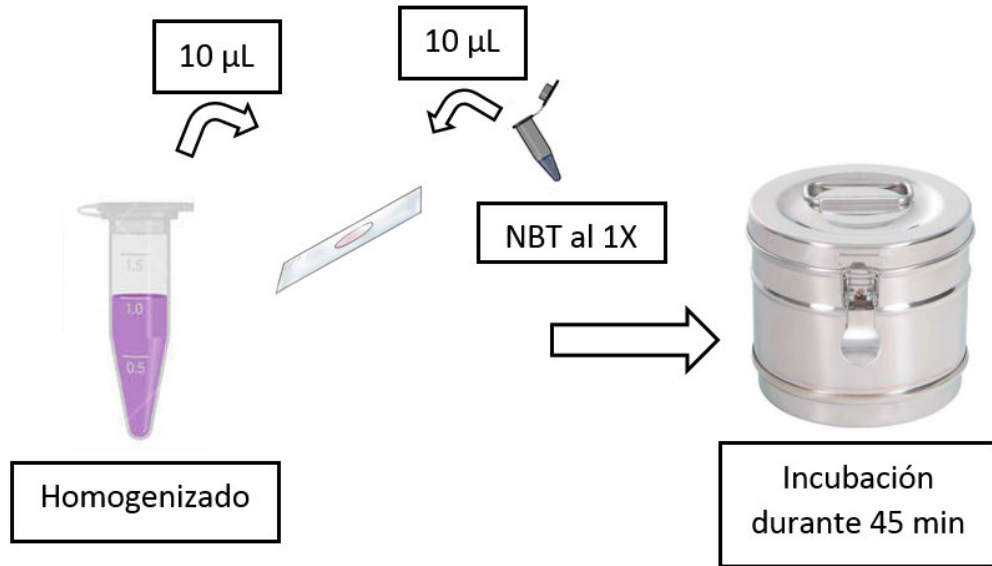


Figura 7. Preparación del sistema de óxido reducción en lámina.

4.2.2.3 Evaluación del estrés oxidativo

Del homogeneizado de espermatozoides provenientes de cada colmena evaluada en este estudio; fueron seleccionados 6 millones de espermatozoides para el sistema óxido reducción en tubos de microcentrifuga de 1.5mL, incluyendo un control en ausencia de NBT. Los espermatozoides seleccionados fueron centrifugados durante 6 minutos a 1600 rpm, el sobrenadante fue descartado, al control se le añade 50 µL de medio HAM F-10 suplementado con 0.4% de BSA mientras que al experimental se le añade 40 µL de medio HAM F-10 suplementado con 0.4% de BSA + 10 µL de NBT 1X. Los tubos de microcentrifuga fueron colocados abiertos en la cámara anaeróbica durante 45 minutos a 37°C, fueron retirados de la cámara anaeróbica y centrifugados durante 7 minutos a 2000 rpm, el sobrenadante fue descartado y el pellet almacenado en 250 µL de agua ultrapura a -20°C

hasta su uso en la cuantificación al espectrofotómetro de las sales de formazán producidas. La Figura 8 resume el proceso de preparación del sistema de óxido reducción en los tubos de microcentrífuga.

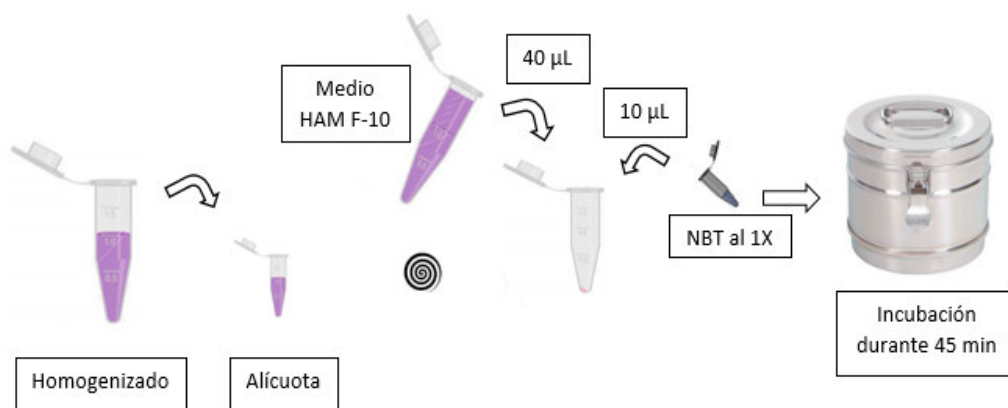


Figura 8. Preparación del sistema de óxido reducción en tubos de microcentrífuga 1.5mL.

4.2.2.4 Cuantificación espectrofotométrica del formazán

4.2.2.4.1 Liberación de sales de formazán, mediante sonicación

Los espermatozoides reaccionados y no reaccionados almacenados a -20°C , fueron descongelados, sonicados en 6 ciclos de 40 segundos cada uno y 5 ciclos de 40 segundos de enfriamiento entre cada sonicated utilizando el sonicador (MISONIX®) (Figura 9), la resuspensión sonicada fue centrifugada durante 7 minutos a 2000 rpm y resuspendidas en 1 mL de etanol absoluto. La nueva resuspensión fue centrifugada durante 10 minutos a 2000 rpm, el sobrenadante fue retirado con mucho cuidado y se conservó para la lectura espectrofotométrica a 570nm en etanol absoluto.



Figura 9. Sonicador (MISONIX®).

4.2.2.4.2 Liberación de sales de formazán, mediante KOH 2M

Los espermatozoides reaccionados y almacenados -20°C , fueron descongelados, centrifugados durante 10 minutos a 2000 rpm y re suspendidos en $50\mu\text{L}$ de KOH 2M, agitados con un agitador vortex durante 4 minutos y nuevamente centrifugados durante 10 minutos a 2000 rpm, el sobrenadante fue retirado con mucho cuidado y se conserva para la lectura espectrofotométrica a 570nm con etanol absoluto.

4.2.3 Integridad de la membrana espermática

La vitalidad de los espermatozoides como parámetro de calidad espermática, se determinó utilizando el porcentaje obtenido por la capacidad osmorreguladora bajo condiciones hiperosmóticas de los espermatozoides. Este caracter, basado en la semipermeabilidad de la membrana celular intacta, provoca que el espermatozoide modifique su forma celular y se doble bajo condiciones hiposmótica, cuando el flujo de agua causa una expansión del volumen de la célula (WHO, 2010), este test fue introducido como un parámetro funcional de la membrana plasmática Jeyendran et al., 1984 dando

información adicional de la integridad a nivel de la membrana celular de los espermatozoides.

Para realizar la prueba de integridad de membrana, se diluye 10 μ L de homogeneizado de espermatozoides de las vesículas seminales en 100 μ L de la solución hiposmótica mantenida en una incubadora durante 30 minutos a 37°C. Los resultados fueron obtenidos a partir de la evaluación de 100 espermatozoides considerando como reaccionados a aquellos que sufrieron algún enrollamiento del flagelo.

4.2.4 Concentración espermática

La concentración de espermatozoides se determinó de acuerdo a las recomendaciones de la OMS, 2010 con el método del hemocitómetro o cámara de Neubauer, la cual contiene 25 cuadrados en la parte central y 16 cuadrados que divide equitativamente cada uno de los 25 cuadrados. Para realizar el conteo, se hizo una dilución de 10 μ L del homogeneizado en 990 μ L de agua, 10 μ L de esta dilución fueron colocados en el filo de la cámara para que difunda por capilaridad a lo largo de esta, tanto en la parte superior como inferior de la cámara, se dejó reposar durante unos 5 minutos para el asentamiento de los espermatozoides. El conteo de los 25 cuadrados a 40X fue realizado en un microscopio de campo claro. Si los espermatozoides se ubican sobre la línea divisoria de dos cuadrados que conforman los 25 cuadrantes, será considerado solo aquellos que están a la derecha y en la parte superior del cuadrado analizado. El número obtenido del conteo se expresó en millones por mL.

4.2.5 Criopreservación y evaluación de espermatozoides post criopreservación

4.2.5.1 Congelamiento

Se preparó un stock de solución crioprotectora con un volumen final de 10mL de acuerdo a lo siguiente: 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO: C_2H_6SO), 30% de medio HAM F-10 y 60% del homogeneizado de vesículas seminales. Luego de su preparación el medio fue filtrado en una campana de flujo laminar y almacenado a 4°C hasta su utilización. Se retiró una alícuota del homogeneizado para iniciar el proceso de congelamiento siguiendo las proporciones mencionadas 2:3 (stock de crioprotector y muestra), el homogeneizado es liberado lentamente sobre el crioprotector. Luego se procedió a cargar 50 μ L de la mezcla en los capilares sin heparina y congelándolo de acuerdo a la patente de (Valdivia & Temoche, 2016) (Figura 10) hasta su evaluación.

4.2.5.2 Evaluación de espermatozoides post criopreservación

Las muestras congeladas en nitrógeno líquido fueron retiradas de los cánister y transportados en una caja de tecnopor para ser incubadas a 37°C durante 5 minutos, la muestra fue recuperada de las pajillas y lavadas en 300 μ L de medio HAM F-10 suplementado con 0.4% de BSA y centrifugadas durante 5 minutos a 1250 rpm. El pellet se resuspende en 100 μ L de medio HAM F-10 suplementado con 0.4% de BSA y se determina los parámetros espermáticos de movilidad, concentración, integridad de membrana, actividad mitocondrial y estrés oxidativo.

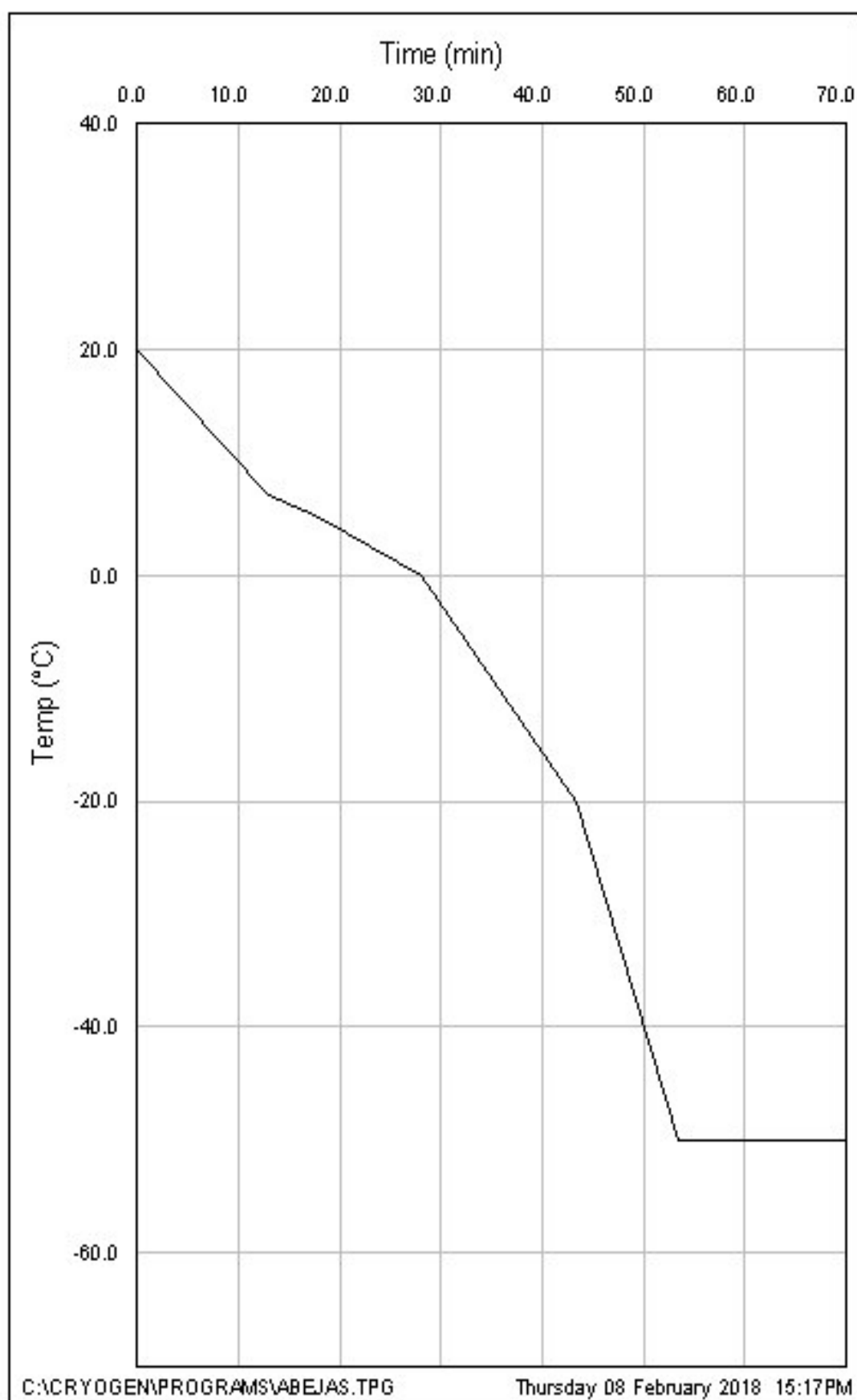


Figura 10. Curva de congelamiento para espermatozoides de zángano. (Valdivia & Temoche, 2016).

4.2.6 Análisis e interpretación de resultados

Se analizaron las variables: movilidad espermática total (MET%), actividad mitocondrial, integridad de membrana y peso de formazán. Para los análisis estadísticos se empleó el software SPSS v.24. Para la normalidad de cada una de las variables fue seleccionada la prueba de K-S para una muestra así como la prueba de Shapiro-Wilk, se calculó el estadístico de correlación entre los parámetros espermáticos, se hicieron comparaciones entre las medias de los grupos utilizando el estadístico T Student como el test de Wilcoxon para aquellos grupos que no contaban con una distribución normal en los grupos antes y después del congelamiento, además se determinó la diferencia existente entre grupos empleando ANOVA de un factor así como el test de Kruskal-Wallis para aquellos grupos que no contaban con una distribución normal. Los valores $p < 0.05$ serán considerados estadísticamente significativos.

V. RESULTADOS

Los resultados son obtenidos de acuerdo al flujograma de trabajo que se presenta en la Figura 3 tanto para los zánganos muestreados en la temporada artificial como en temporada natural. Para determinar el efecto de la criopreservación sobre la actividad mitocondrial y el estrés oxidativo, se determinó los parámetros espermáticos antes y después del congelamiento.

5.1 Curva de calibración

Las sales de formazán fueron diluidas de tal forma que se obtuvieron concentraciones definidas de dicha sal para sus correspondientes lecturas de absorbancia por el espectrofotómetro que se presentan en la Tabla 1. Los datos de absorbancia correlacionados con los de concentración de sales de formazán permitiendo obtener la ecuación de la recta como se indica en la ecuación 1 (Figura 11).

Ecuación 1.

$$Y = 4,4595x - 0.0439$$

Tabla 1. Datos de absorbancia obtenidas a diferentes concentraciones en µg/mL de formazán.

	W= 8.5 mg	Blanco: 0.006	ESTANDARES DE FORMAZÁN	λ = 570nm	
F.D.	Absorbancia	Absorbancia - Blanco	*inversa de factor de dilucion (1/4)	Factor de dilución total	[] mg/ml
(2 ⁰)	ERROR se diluye	-	-	0,2500000000	2,12500000000
(2 ⁻¹)	2.1 - 1.8 se diluye	-	-	0,1250000000	1,06250000000
(2 ⁻²)	0,609	0,603	2,4120	0,0625000000	0,53125000000
(2 ⁰)(5 ⁻¹)	0,463	0,457	1,8280	0,0500000000	0,42500000000
(2 ⁻³)	0,290	0,284	1,1360	0,0312500000	0,26562500000
(2 ⁻¹)(5 ⁻¹)	0,206	0,200	0,8000	0,0250000000	0,21250000000
(2 ⁰)(5 ⁻¹)(3 ⁻¹)	0,136	0,130	0,5200	0,0166666667	0,14166666667
(2 ⁻⁴)	0,135	0,129	0,5160	0,0156250000	0,13281250000
(2 ⁻²)(5 ⁻¹)	0,106	0,100	0,4000	0,0125000000	0,10625000000
(2 ⁻⁵)	0,070	0,064	0,2560	0,0078125000	0,06640625000
(2 ⁻³)(5 ⁻¹)	0,060	0,054	0,2160	0,0062500000	0,05312500000
(2 ⁻⁶)	0,040	0,034	0,1360	0,0039062500	0,03320312500
(2 ⁻⁷)	0,036	0,030	0,1200	0,0019531250	0,01660156250
(2 ⁻⁸)	0,011	0,005	0,0200	0,0009765625	0,00830078125

F.D: Factor de dilución

W: peso del formazán resuspendido= “peso d”

λ: Longitud de onda

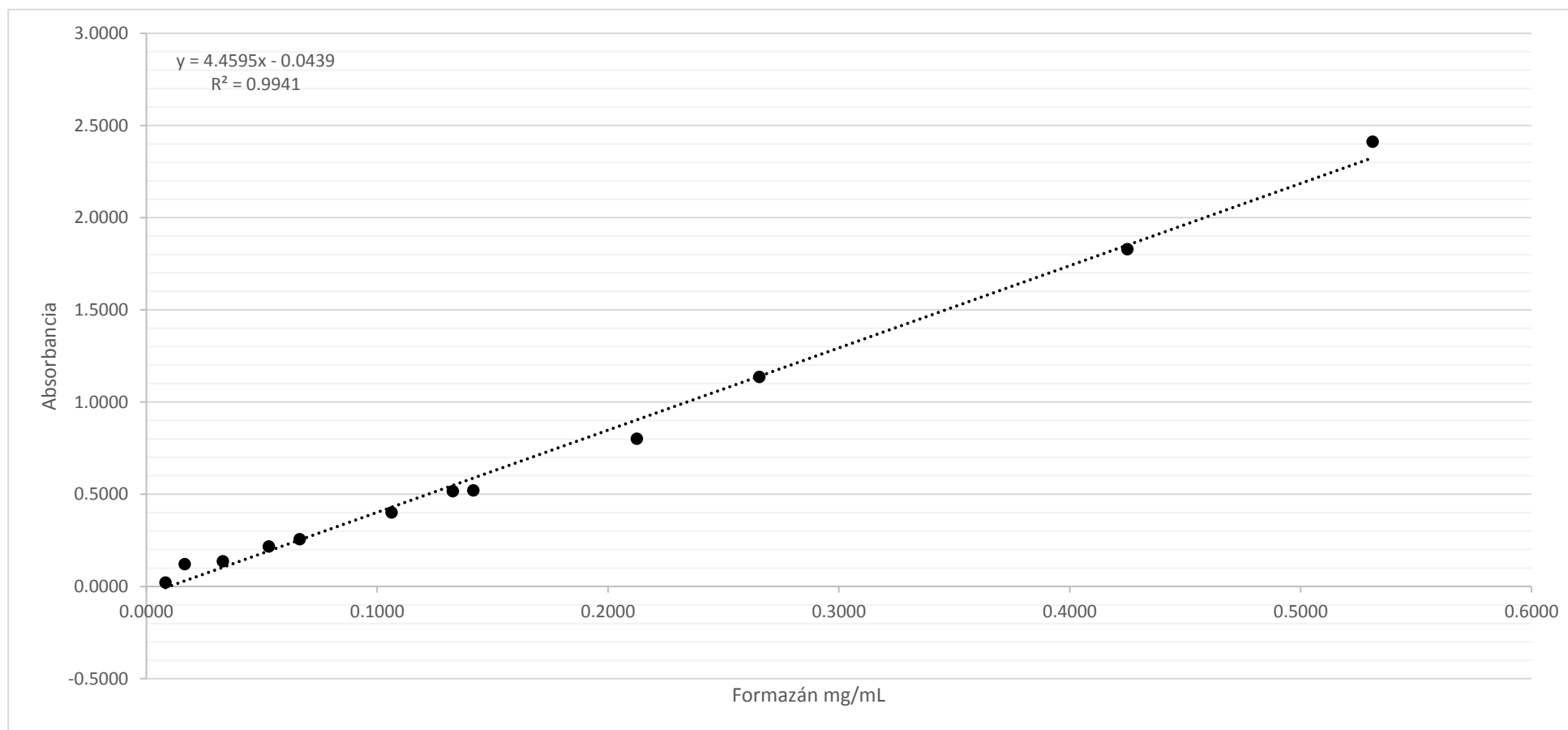


Figura 11. Curva de calibración del formazán. Se muestra una dependencia de función lineal con pendiente positiva y con un coeficiente de correlación de casi la unidad.

5.2 Obtención de sales de formazán

5.2.1 Comparación de los métodos de liberación de sales de formazán por sonicación y el método de lisis con KOH 2M

Los resultados obtenidos luego de la sonicación, en base a 6 millones de espermatozoides produjo un mínimo de 11.25µg de formazán y de 23.28µg como máximo teniendo como valor promedio 17.13µg (Tabla 2). La cantidad mínima y máxima de sales de formazán liberadas luego de la lisis con KOH 2M fue de 12.14µg y 25.51µg respectivamente con un promedio de 16.02µg (Tabla 2 y Anexo 3). No se observa una diferencia significativa entre la obtención de sales de formazán empleando el método de sonicación (método físico) y el método de lisis celular con el KOH 2M (método químico), $p>0.05$. Por lo tanto, los procedimientos posteriores se realizaron solo utilizando el método de liberación química del formazán por lisis.

5.2.2 Liberación de sales de formazán por lisis con KOH 2M en zánganos artificialmente y naturalmente producidos

De 6 millones de espermatozoides de zánganos generados artificialmente fueron recuperados un valor mínimo de 12.14µg de sales de formazán y un valor máximo de 25,51µg de sales de formazán (Tabla 3), mientras que para los 6 millones de espermatozoides de zánganos generados naturalmente fue obtenido un valor mínimo de 11,25µg de sales de formazán y un valor máximo de 17,93µg de sales de formazán (Tabla 3).

Tabla 2. Peso de formazán recuperado de las muestras sometidas a sonicación y a lisis con KOH 2M.

	Wformazán (μg) pre criopreservación									
	Col. 1.A	Col. 2.A	Col. 3.A	Col. 4.A	Col. 5.A	Col. 6.A	Col. 7.A	Col. 8.A	Col. 9.A	Col. 10.A
Sonicado	17.04	11.25	20.16	23.28	14.37	17.49	17.49	21.50	17.49	11.25
KOH 2M	25.51	21.95	16.60	13.47	14.81	14.81	12.14	16.60	12.14	12.14

Los valores de *p value* no poseen una diferencia estadísticamente significativa con los diferentes métodos de recuperación de formazán ($p>0.05$).

W_{formazán}: Peso de sales de formazán

Col.: colmena

KOH 2M: Hidróxido de potasio 2 Molar

Tabla 3. Peso de formazán recuperado de las muestras sometidas a lisis con KOH 2M para ambas temporadas pre criopreservación.

	Wformazán (μg) pre criopreservación									
	Col. 1	Col. 2	Col. 3	Col. 4	Col. 5	Col. 6	Col. 7	Col. 8	Col. 9	Col. 10
Temporada artificial	25.51	21.95	16.60	13.47	14.81	14.81	12.14	16.60	12.14	12.14
Temporada natural	12,14	11,25	14,81	11,69	11,25	11,25	17,93	11,25	17,04	11,69

Los valores de *p value* muestran una diferencia estadísticamente significativa entre ambas temporadas ($p<0.05$).

W_{formazán}: Peso de sales de formazán

Col.: colmena

KOH 2M: Hidróxido de potasio 2 Molar

5.3 Resultados pre criopreservación de la temporada artificial y natural

5.3.1 Parámetros espermáticos de los zánganos durante la temporada artificial

Las muestras frescas recuperados de las vesículas seminales en medio HAM F-10 suplementadas con 0.4% de BSA fueron observadas luego de 10 minutos de estabilización en el medio. El parámetro de movilidad espermática de los zánganos mostró un valor mínimo de 14.2% en la Col. 2.A y máximo de 53.7% en la Col. 6.A. Una integridad de membrana con un valor mínimo de 27.5% en la Col. 8.A y un máximo de 72.2% en la Col. 6.A, así como una concentración espermática desde 10 millones a 23 millones en la Col. 5.A y la Col. 7.A respectivamente (Tabla 4). Además, se presentó un porcentaje promedio de MET \pm SEM de 30.8 ± 3.8 , un Host + (%) de 47.2 ± 4.4 (Tabla 5).

Tabla 4. Resultados de los parámetros espermáticos pre y post criopreservación de la temporada artificial, concentración expresada en millones de espermatozoides/mL.

COLMENAS	[] millones de esperm. Por 5 abejas	pre criopreservación				post criopreservación			
		Movilidad (%)	HOST + (%)	NBT + (%)	Peso Formazán (μg)	Movilidad (%)	HOST + (%)	NBT + (%)	Peso Formazán (μg)
Col.1.A	21	39,9	62,9	65,79	25,51	0,0	17,3	30,19	11,25
Col.2.A	17	14,2	52,3	23,28	21,95	7,2	10,0	64,93	13,92
Col.3.A	16	31,7	43,3	45,05	16,60	5,4	24,3	44,14	11,69
Col.4.A	22	25,0	35,9	52,48	13,47	0,0	6,5	44,19	16,60
Col.5.A	10	18,4	29,2	44,03	14,81	0,0	11,5	54,12	11,25
Col.6.A	14	53,7	72,2	49,55	14,81	1,0	15,1	37,62	11,69
Col.7.A	23	38,4	50,8	57,58	12,14	7,9	14,3	68,87	11,25
Col.8.A	13	25,5	27,5	57,03	16,60	6,0	10,6	28,10	31,75
Col.9.A	17	21,6	47,9	64,03	12,14	0,0	16,9	29,81	17,49
Col.10.A	17	39,6	50,0	53,33	12,14	7,6	12,0	48,91	11,25

Tabla 5. Cuadro resumen de la media \pm SEM de los grupos pre y post criopreservación y valores de significancia de la correlación entre los parámetros de calidad espermática de la temporada artificial

					<i>P values</i>					
	MET %	Host + (%)	NBT + (%)	W _{formazán}	MET %	MET %	MET %	Host + (%)	Host + (%)	NBT + (%)
					vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
					Host + (%)	NBT + (%)	W _{formazán}	NBT + (%)	W _{formazán}	W _{formazán}
Pre criopreservación	30.8 \pm 3.8	47.2 \pm 4.4	51.2 \pm 3.8	16.0 \pm 1.4	.025	.230	.919	.848	.708	.503
Post criopreservación	3.5 \pm 1.1	13.0 \pm 1.5	45.0 \pm 4.5	14.8 \pm 2.0	.718	.178	.629	.515	.377	.098

Los datos son expresados como media \pm SEM. Los valores de $p < 0.05$ poseen una correlación estadísticamente significativa.

MET%: Movilidad espermática total Host + (%): integridad de membrana NBT + (%): actividad mitocondrial W_{formazán}: Peso de formazán

Se determinó la correlación Pearson (Figura 12) entre el MET % y el Host + (%) donde se observa una moderada correlación de pendiente positiva, con un índice de correlación de 0.697 y un $p < 0.05$ (Tabla 5).

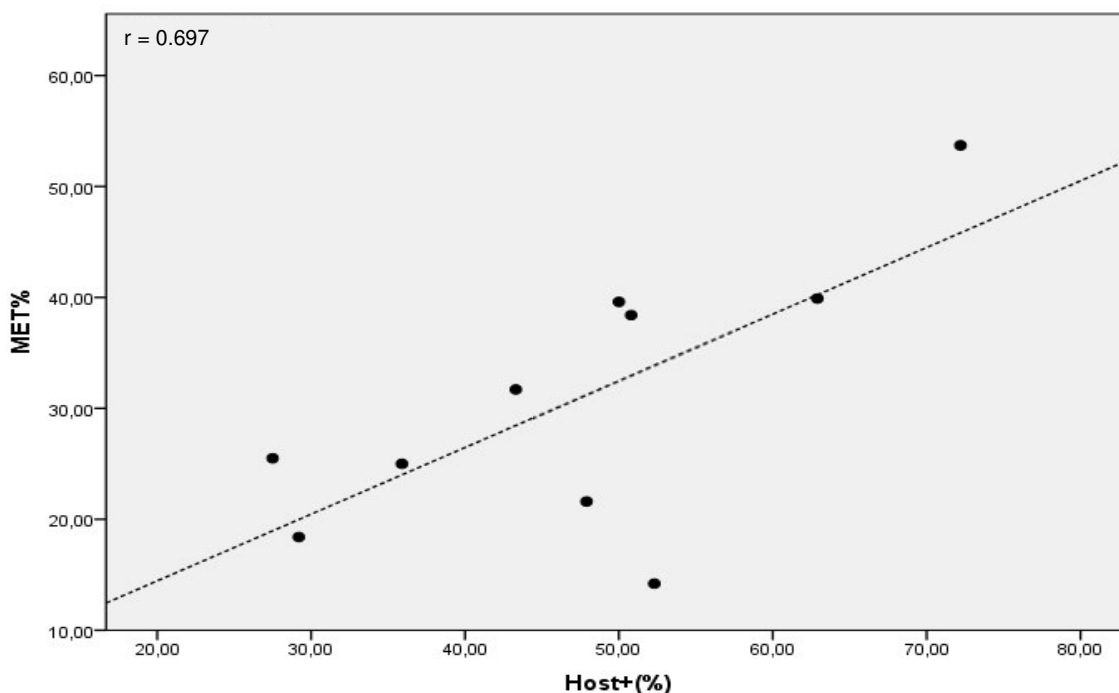


Figura 12. Correlación entre la movilidad espermática total y la integridad de membrana correspondiente a los espermatozoides de la temporada artificial pre criopreservación.

5.3.2 Actividad mitocondrial de los espermatozoides de la temporada artificial

De acuerdo al método de preparación del sistema de óxido-reducción en lámina (Figura 7) se observó la cantidad de espermatozoides que redujeron el NBT en cristales de formazán a consecuencia de la actividad mitocondrial de cada espermatozoide. Los zánganos de las colmenas mostraron un valor mínimo y máximo de la actividad mitocondrial que va de 23.28% a 65.79% en la Col. 2.A y la Col. 1.A respectivamente (Tabla 4), con un promedio de las colonias de $51.2\% \pm 3.8$ (Tabla 5), se presentó una tendencia positiva entre la movilidad espermática total y los NBT positivos, siendo el índice R de 0.417 (Figura 13A) y un índice R de 0.07 entre la integridad de membrana

con la actividad mitocondrial (Figura 13B), aunque no se aprecia una significancia entre la correlación de estos índices de calidad espermática (Tabla 5).

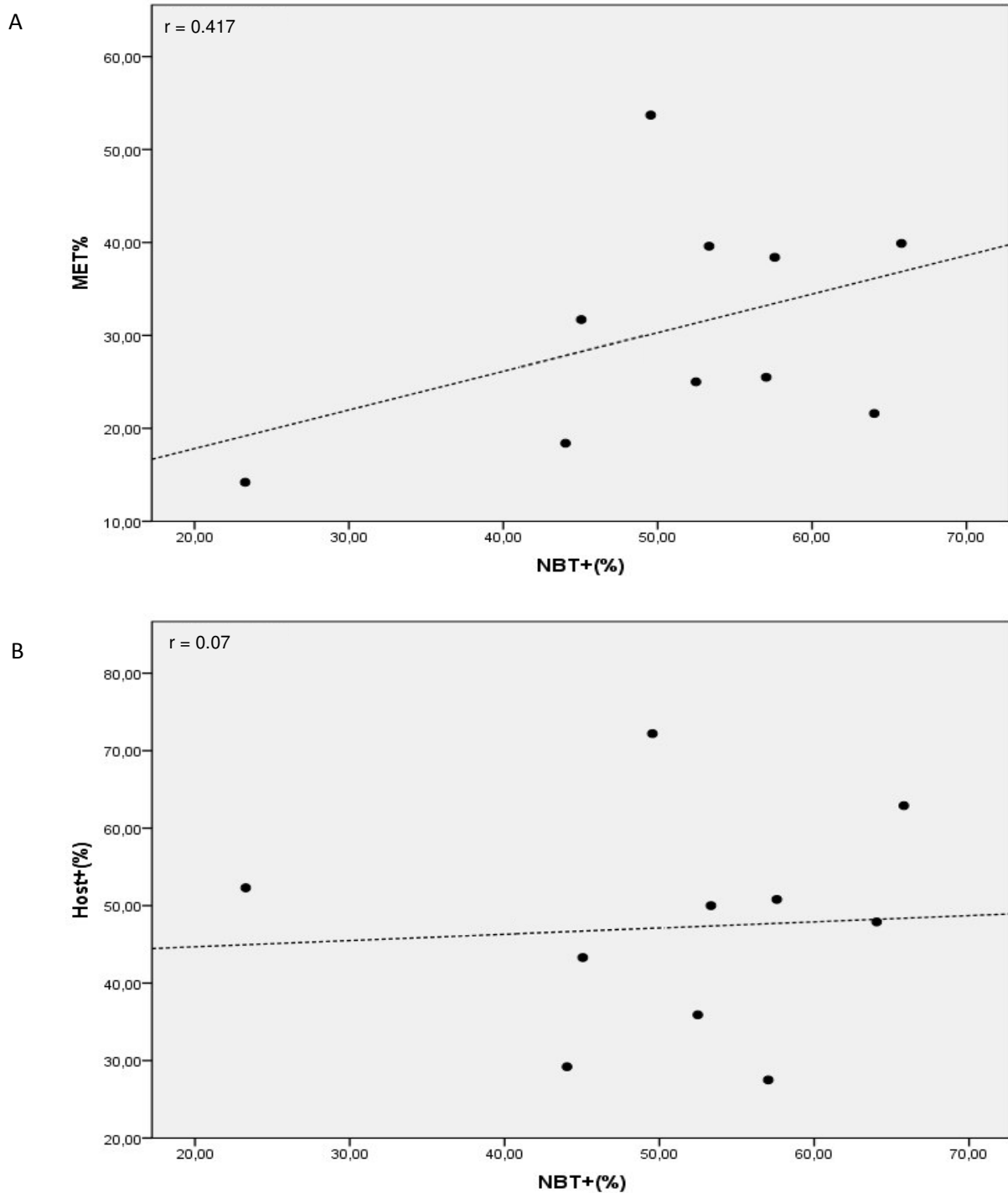


Figura 13. Gráficos de correlación correspondiente a los espermatozoides de la temporada artificial. A) Correlación entre la movilidad espermática total y los espermatozoides con actividad mitocondrial positiva. B) Correlación entre los NBT + (%) y la cantidad generada de formazán en microgramos de 6 millones de espermatozoides pre criopreservación.

Además, se presentó un bajo índice de correlación negativo entre la actividad mitocondrial y el peso de formazán, siendo el índice R de 0.209 (Figura 14), aunque no se aprecia una significancia entre la correlación de estos índices de calidad espermática (Tabla 5).

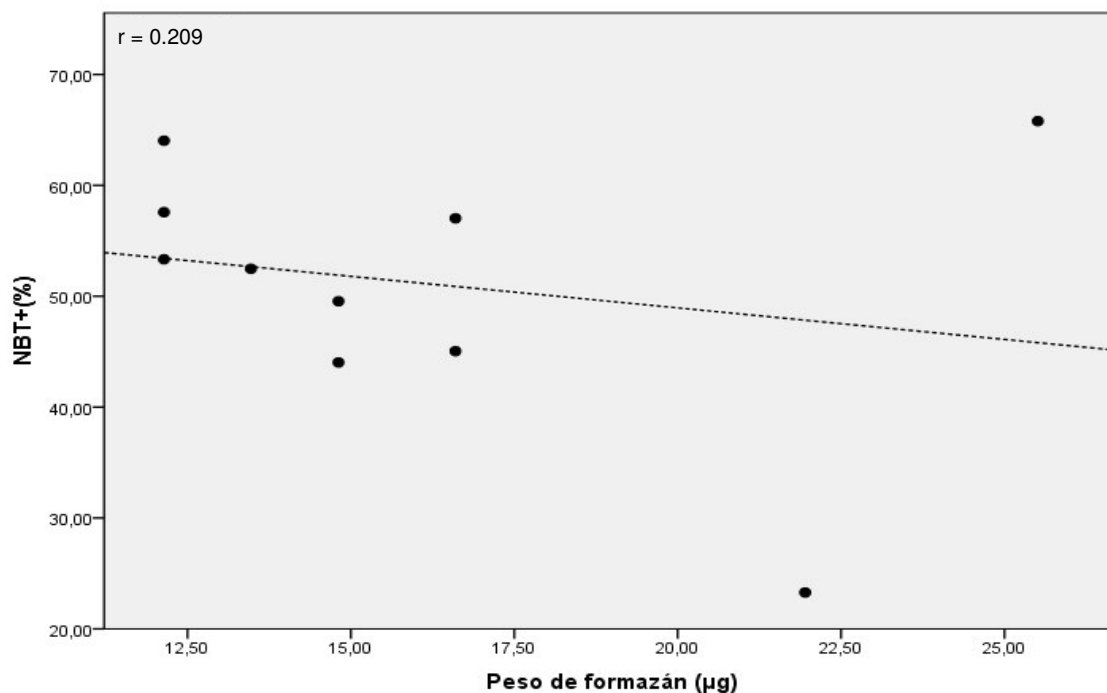


Figura 14. Gráfico de correlación entre la actividad mitocondrial y la cantidad generada de formazán en microgramos de 6 millones de espermatozoides correspondientes a los espermatozoides de la temporada artificial pre criopreservación.

5.3.3 Estrés oxidativo de los espermatozoides de la temporada artificial

Los zánganos de las colmenas registraron un valor mínimo de 12.14µg de formazán en la Col. 7.A, Col. 9.A y la Col. 10.A y un valor máximo de 25.51µg de formazán en la Col. 1.A (Tabla 4), con un promedio de las colonias de $16.0\% \pm 1.4$ (Tabla 5), se presentó bajo índice de correlación negativa entre la movilidad espermática total y el peso de formazán, siendo el índice R de 0.084 (Figura 15A) y un medio índice de correlación positiva, siendo el índice R de 0.279 entre la integridad de membrana con el peso de

formazán (Figura 15B), aunque no se aprecia una significancia entre la correlación de estos índices de calidad espermática (Tabla 5).

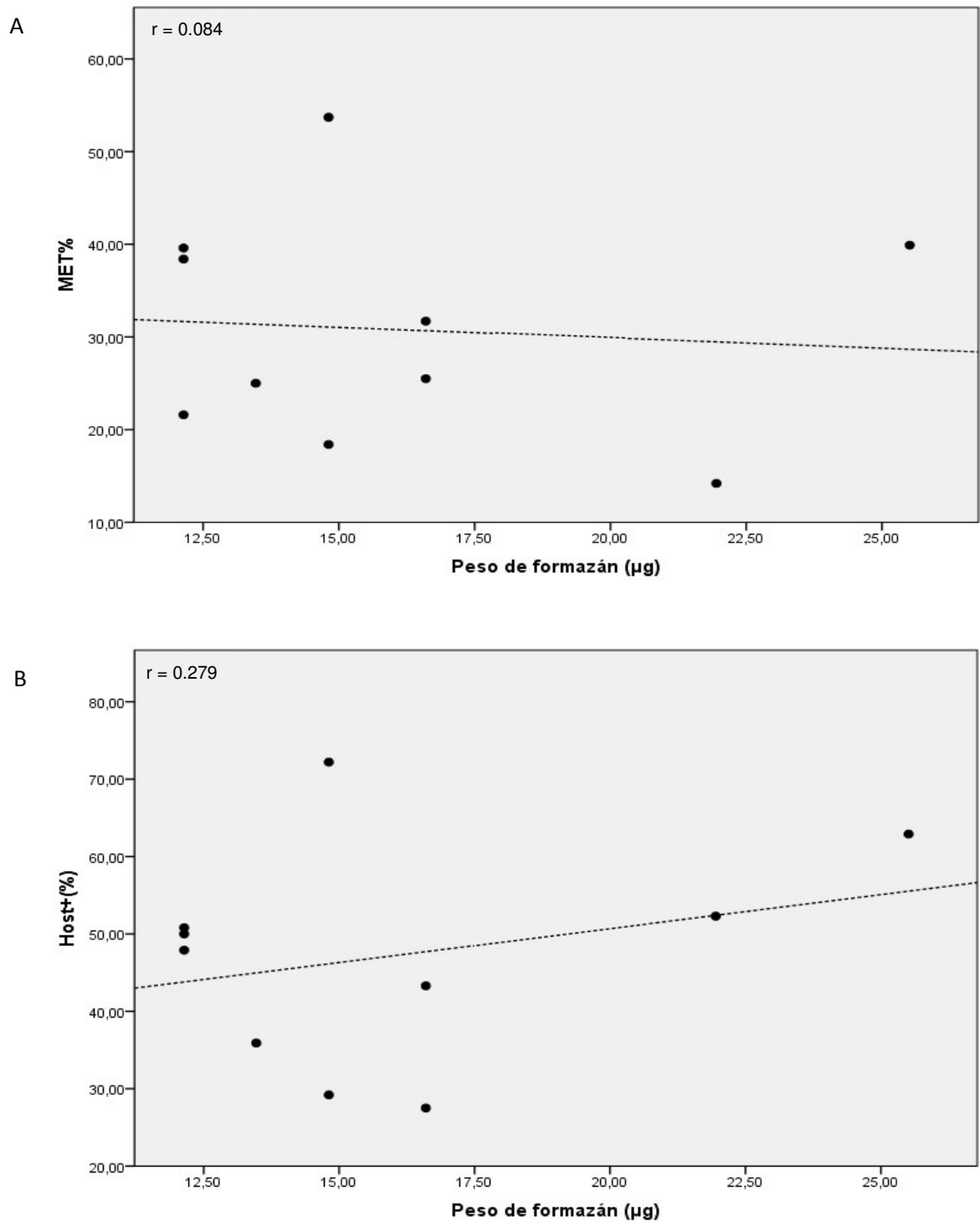


Figura 15. Gráficos de correlación correspondiente a los espermatozoides de la temporada artificial pre criopreservación. A) Correlación entre la movilidad espermática total y la cantidad generada de formazán en microgramos de 6 millones de espermatozoides. B) Correlación entre la integridad de membrana y la cantidad generada de formazán en microgramos de 6 millones de espermatozoides.

5.3.4 Parámetros espermáticos de los zánganos durante la temporada natural

La MET% mostró un valor mínimo de 21.9% en el subgrupo 1 de la Col. 8.N y un máximo de 69.69% en el subgrupo 2 de la Col. 5.N. Un valor mínimo y máximo en la integridad de membrana de 36.99% y 81.3% en el subgrupo 1 de la Col. 6.N y en el subgrupo 2 de la Col. 1.N respectivamente y una concentración de valor mínimo de 11 y un valor máximo de 28 millones en la Col. 9.N y Col. 2.N respectivamente (Tabla 7). Además, se presentó como parámetros espermáticos total un MET % promedio de 48.79 ± 2.5 y un Host + (%) promedio de 60.39 ± 2.34 (Tabla 6) encontrándose diferencias significativas de la media de la Col. 2.N con la Col. 7.N y la Col. 8.N, diferencia significativa de la media de la Col. 5.N con la Col. 6.N, Col. 7.N y la Col. 8.N con respecto al MET % (Anexo 4). Diferencias significativas de la media de la Col. 6.N con la Col. 1.N, diferencia significativa de la media de la Col. 1.N con la Col. 7.N y diferencia significativa de la media de la Col. 2.N con la Col. 6.N y Col. 7.N con respecto a la integridad de membrana (Anexo 5).

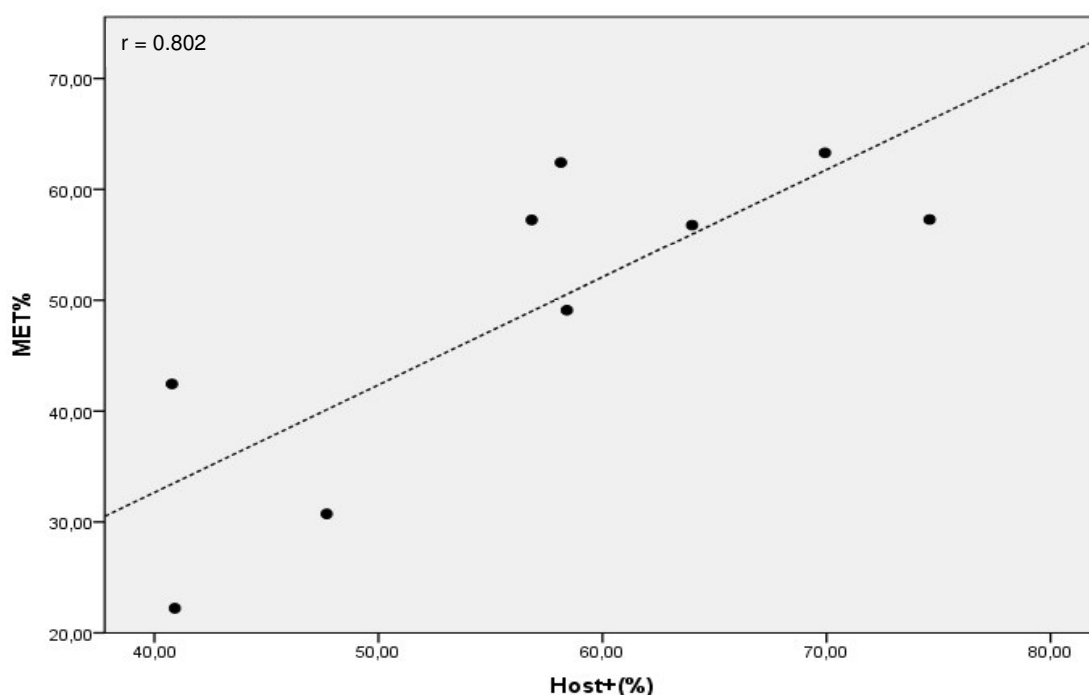


Figura 16. Correlación entre la movilidad espermática total y la integridad de membrana correspondientes a espermatozoides de la temporada natural pre criopreservación.

Se determinó la correlación Pearson (Figura 16) entre el MET % y el Host + (%) donde se observa una a correlación de pendiente positiva, con un índice de correlación de 0.802 y un $p < 0.05$ (Tabla 6).

Tabla 6. Cuadro resumen de la media \pm SEM de los grupos pre y post criopreservación y valores de significancia de la correlación entre los parámetros de calidad espermática de la temporada natural.

	MET %	Host + (%)	NBT + (%)	Wformazán	<i>P values</i>					
					MET %	MET %	MET %	Host + (%)	Host + (%)	NBT + (%)
					vs.	vs.	vs.	vs.	vs.	vs.
					Host + (%)	NBT + (%)	Wformazán	NBT + (%)	Wformazán	Wformazán
Pre criopreservación	48.79 \pm 2.5	60.39 \pm 2.34	67.74 \pm 2.29	13.03 \pm 0.82	.005	.573	.320	.540	.973	.197
Post criopreservación	13.25 \pm 1.66	19.66 \pm 2.16	64.45 \pm 2.01	13.01 \pm 1.5	.067	.626	.959	.432	.544	.369

Los datos son expresados como media \pm SEM. Los valores de $p < 0.05$ poseen una correlación estadísticamente significativa. MET%: Movilidad espermática total Host + (%): integridad de membrana NBT + (%): actividad mitocondrial Wformazán: Peso de formazán

5.3.5 Actividad mitocondrial de los espermatozoides de la temporada natural

El porcentaje de la actividad mitocondrial espermática de los zánganos mostraron un valor mínimo y máximo de 40.65% y 88.98% del subgrupo 3 de la Col. 2.N y del subgrupo 4 de la Col. 3.N respectivamente en la actividad mitocondrial (Tabla 7), con un promedio de la actividad mitocondrial de 67.74 \pm 2.29 (Tabla 6), encontrándose diferencias significativas de la media de la Col. 2.N con la Col. 1.N y la Col. 4.N, con respecto a su actividad mitocondrial (Anexo 6).

Se presentó un bajo índice de correlación entre la movilidad espermática total y los espermatozoides NBT positivos de 0.203 (Figura 17), así como entre la integridad de membrana con la actividad mitocondrial con índice R de 0.221 (Figura 18), sin significancia entre la correlación de estos índices de calidad espermática (Tabla 6).

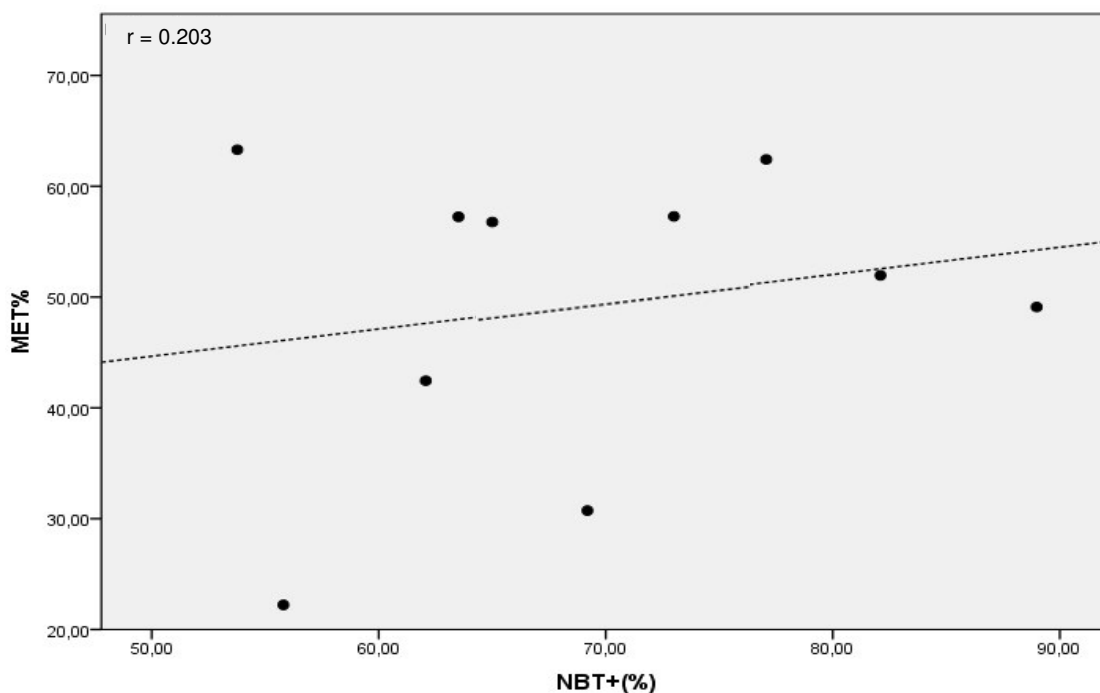


Figura 17. Correlación entre la movilidad espermática total y la actividad mitocondrial correspondientes a espermatozoides de la temporada natural pre criopreservación.

Además, se encontró una correlación positiva entre la actividad mitocondrial y el peso de formazán, siendo el índice R de 0.386 (Figura 19), aunque no se aprecia una significancia entre la correlación de estos índices de calidad espermática (Tabla 6).

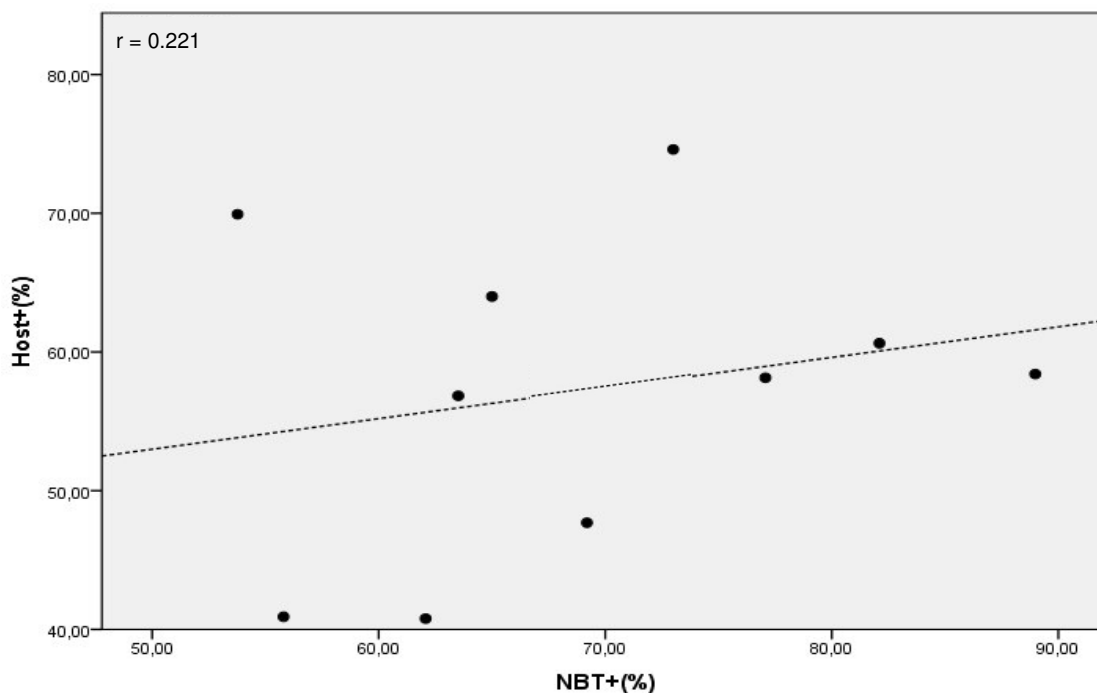


Figura 18. Correlación entre la integridad de la membrana y la actividad mitocondrial correspondientes a espermatozoides de la temporada natural pre criopreservación.

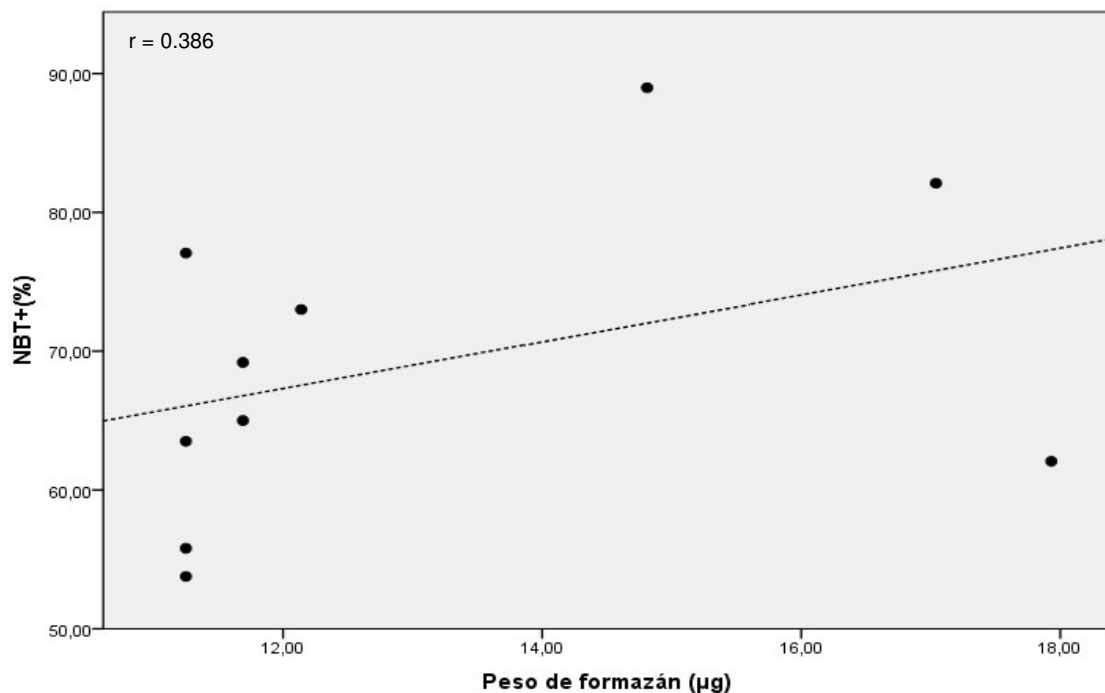


Figura 19. Correlación entre la actividad mitocondrial y la cantidad generada de formazán en microgramos de 6 millones de espermatozoides correspondientes a espermatozoides de la temporada natural pre criopreservación.

5.3.6 Estrés oxidativo de los espermatozoides de la temporada natural

El peso de formazán obtenidos luego de la evaluación del estrés oxidativo mostraron un valor mínimo de 11.25µg en los subgrupos 4 de las Col. 5.N, Col 6.N y Col, 8.N y un valor máximo de 17.93 µg en el subgrupo 4 de la Col. 7.N (Tabla 7), con un promedio entre los espermatozoides de estas colonias de 13.03 ± 0.82 (Tabla 6), se presentó una baja correlación negativa entre la movilidad espermática total y el peso de formazán, siendo el índice R de 0.095 (Figura 20.A) y una media correlación negativa, siendo el índice R de 0.270 entre la integridad de membrana con el peso de formazán (Figura 20.B), aunque no se aprecia una significancia entre la correlación de estos índices de calidad espermática (Tabla 6).

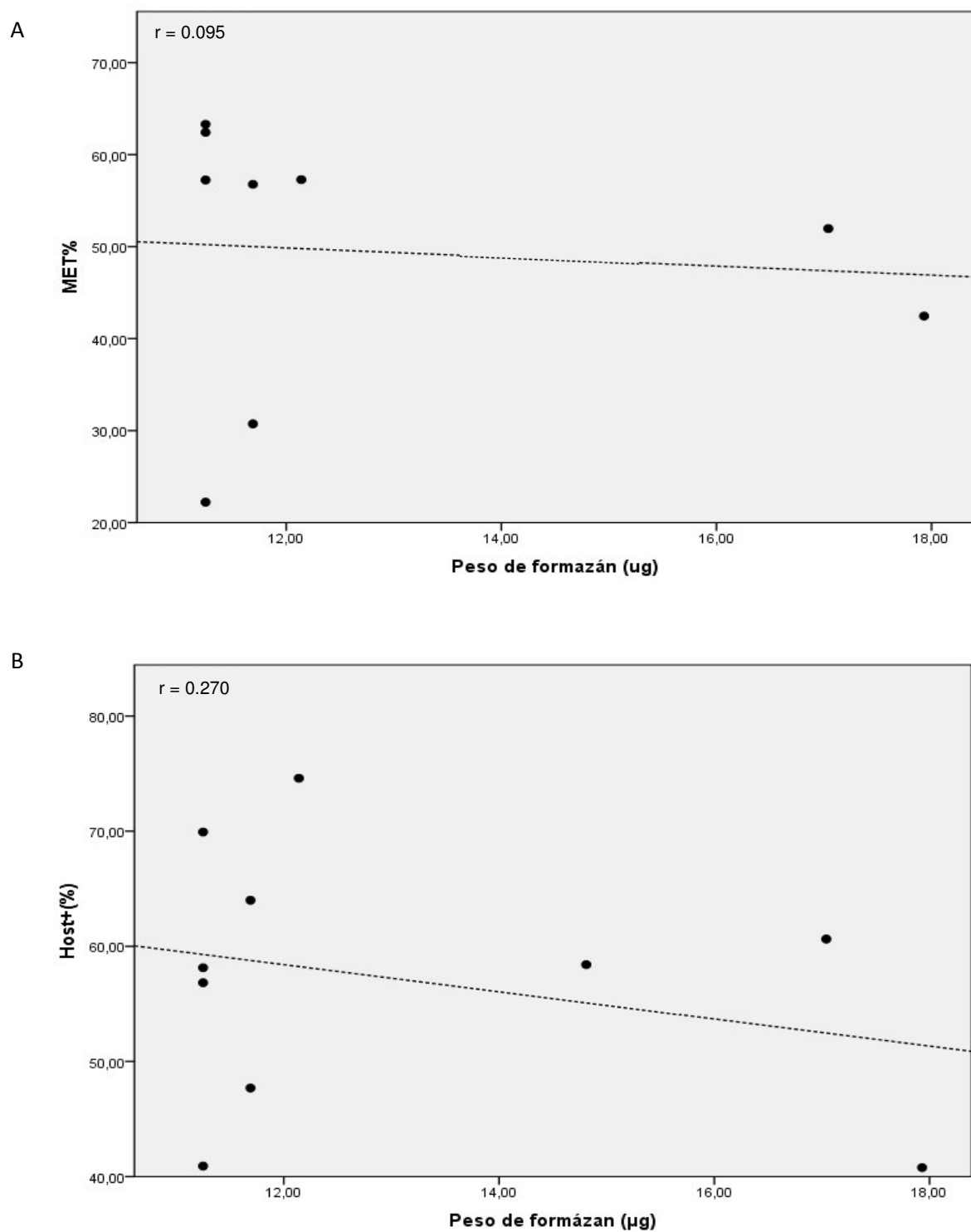


Figura 20. Gráficos de correlación correspondiente a los espermatozoides de la temporada natural pre criopreservación. A) Correlación entre la movilidad espermática total y la cantidad generada de formazán en microgramos de 6 millones de espermatozoides B) Correlación entre la integridad de membrana y la cantidad generada de formazán en microgramos de 6 millones de espermatozoides.

Tabla 7. Resultados de los parámetros pre y post criopreservación de la temporada natural, concentración expresada en millones de spem/mL.

COLMENAS	[] millones de esperm.	SUBGRUPOS	Pre criopreservación				Post criopreservación			
			MET%	HOST + (%)	NBT + (%)	Wformazán (µg)	MET%	HOST + (%)	NBT + (%)	Wformazán (µg)
Col. 1	17	1	53,72	76,92	75,21		11,65	16,67	57,61	
		2	62,50	81,30	84,17		9,16	9,68	38,66	
		3	46,73	64,00	81,95		10,88	11,32	50,47	
		4	57,28	74,60	73,00	12,14	8,94	10,17	58,72	11,25
Col. 2	28	1	51,15	70,77	61,34		9,13	7,44	77,11	
		2	62,94	72,30	47,41		1,94	1,96	51,85	
		3	66,46	70,29	40,65		0,99	2,88	74,07	
		4	63,30	69,93	53,77	11,25	21,00	28,57	59,13	26,40
Col. 3	14	4	49,10	58,41	88,98	14,81	6,79	23,57	63,39	12,14
Col. 4	20	1	51,22	63,48	87,77		22,79	30,83	83,05	
		2	58,42	75,37	82,73		21,62	34,02	66,41	
		3	47,93	68,42	76,22		24,53	24,76	47,69	
		4	56,77	64,00	65,00	11,69	20,72	38,57	69,84	11,02
Col. 5	23	1	61,35	55,45	45,58		7,17	15,73	76,47	
		2	69,69	74,53	68,23		2,51	11,61	67,31	
		3	66,24	49,57	80,38		8,97	15,04	73,50	
		4	62,42	58,14	77,07	11,25	7,21	22,73	84,76	11,02
Col. 6	14	1	27,54	36,99	74,17		0,99	3,74	61,54	
		2	38,51	53,33	59,12		21,49	9,35	41,44	
		3	37,50	38,20	56,33		11,50	8,89	72,64	
		4	57,24	56,84	63,51	11,25	27,47	42,64	75,45	11,02
Col. 7	21	1	35,00	45,71	74,61		2,90	8,82	67,92	
		2	36,79	61,86	60,77		2,31	20,54	56,78	
		3	24,29	37,35	75,15		4,55	9,71	74,36	
		4	42,45	40,78	62,07	17,93	20,00	18,25	67,62	11,47
Col. 8	20	1	21,90	60,61	59,83		32,99	39,39	69,30	
		2	55,56	68,42	56,03		19,90	40,80	60,87	
		3	43,54	75,21	61,94		31,88	27,66	67,52	
		4	22,22	40,91	55,80	11,25	9,79	19,70	54,23	11,02
Col. 9	11	4	51,96	60,63	82,10	17,04	12,82	36,54	60,53	11,69
Col. 10	17	4	30,73	47,69	69,19	11,69	16,20	18,03	67,65	13,03

5.4 Resultados post criopreservación de la temporada artificial y natural

5.4.1 Parámetros espermáticos de los zánganos durante la temporada artificial

Después de la criopreservación, los espermatozoides de zángano mostraron una movilidad con un valor mínimo de 0.0% en las Col.1.A, Col. 4.A, Col. 5.A y Col. 9.A así como un valor máximo de 7.9% en la Col. 7.A. Un valor mínimo y máximo en la integridad de membrana que va de 6.5% a 24.3% en las Col. 4.A y Col. 3.A, respectivamente (Tabla 4). Además, se presentó como parámetros espermáticos un MET % promedio de 3.5 ± 1.1 , un Host + (%) promedio de 13 ± 1.5 (Tabla 5). Se determinó la correlación Pearson de pendiente negativa (Figura 21) entre el MET % y el Host + (%) donde se observa una correlación negativa, con un índice de correlación de 0.052 y un $p > 0.05$ (Tabla 5).

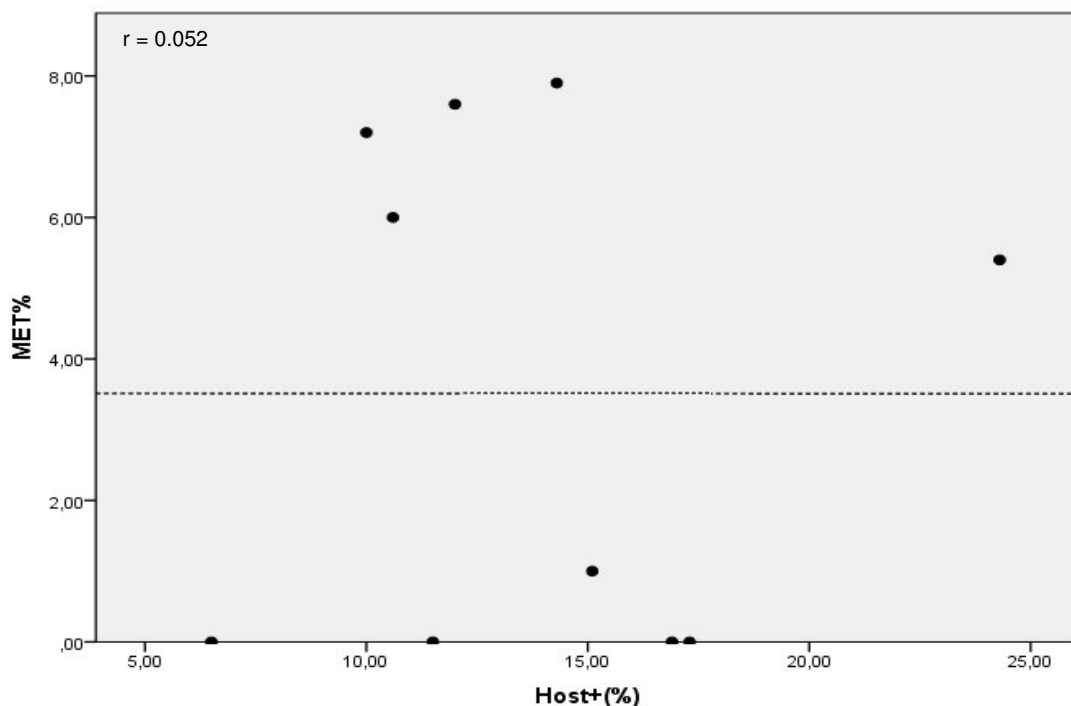


Figura 21. Correlación entre la movilidad espermática total y la integridad de membrana correspondiente a los espermatozoides de la temporada artificial post criopreservación.

5.4.2 Actividad mitocondrial de los espermatozoides de la temporada artificial

En actividad mitocondrial post criopreservación se registró un valor mínimo de 28.1% y un máximo de 68.9% en la Col. 8.A y la Col. 7.A respectivamente (Tabla 4), con un promedio de las colonias de 45 ± 4.5 (Tabla 5), además se presentó una moderada correlación positiva entre la movilidad espermática total y los NBT positivos, siendo el índice R de 0.531 (Figura 22). Se observa una baja correlación negativa, siendo el índice R de 0.234 entre la actividad mitocondrial con la integridad de membrana (Figura 23A), y una media correlación negativa, siendo el índice R de 0.483 entre la actividad mitocondrial y el peso de formazán (Figura 23B), aunque no se aprecia una significancia entre la correlación de estos índices de calidad espermática (Tabla 5).

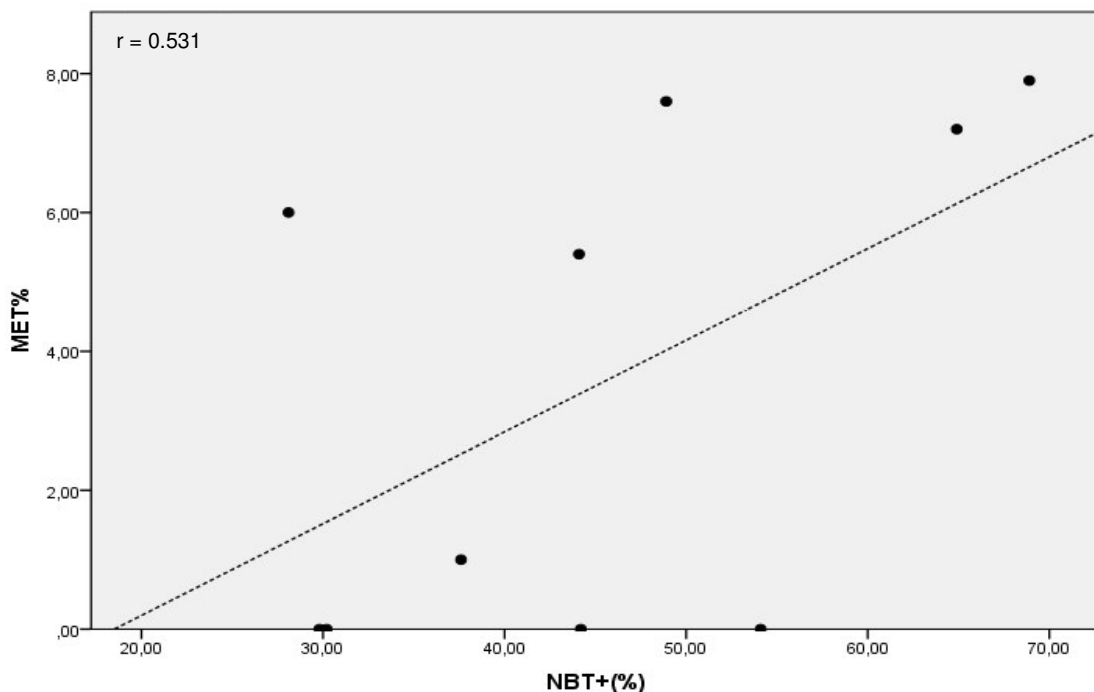


Figura 22. Correlación entre la movilidad espermática total y los espermatozoides con actividad mitocondrial correspondiente a la temporada artificial post criopreservación.

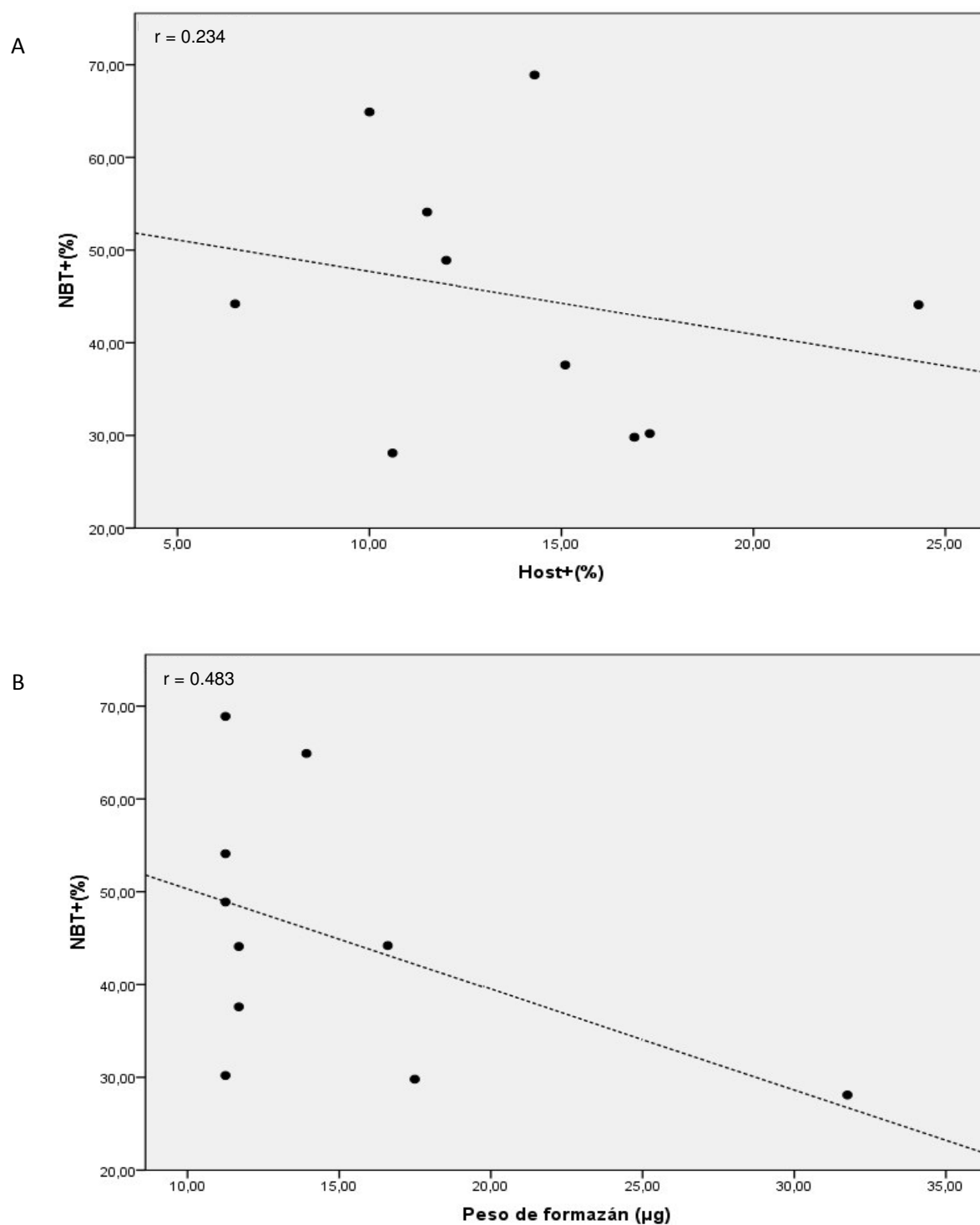


Figura 23. Gráficos de correlación correspondiente a los espermatozoides de la temporada artificial post criopreservación. A) Correlación entre la actividad mitocondrial y el índice de integridad de membrana. B) Correlación entre la actividad mitocondrial y la cantidad generada de formazán en microgramos de 6 millones de espermatozoides.

5.4.3 Estrés oxidativo de los espermatozoides de la temporada artificial

Se registraron valores que van de 11.25 µg en la Col. 1.A, Col. 5.A, Col. 7.A y Col. 10.A a un valor máximo de 31.75 µg en la Col. 8.A para los valores de estrés oxidativo (Tabla 4), con un promedio de las colonias de $14.8\% \pm 2$ (Tabla 5), además se presentó una baja correlación positiva entre la movilidad espermática total y el peso de formazán, siendo el índice R de 0.095 (Figura 24) y una media correlación negativa, siendo el índice R de 0.322 entre la integridad de membrana con el peso de formazán (Figura 25), aunque no se aprecia una significancia entre la correlación de estos índices de calidad espermática (Tabla 5).

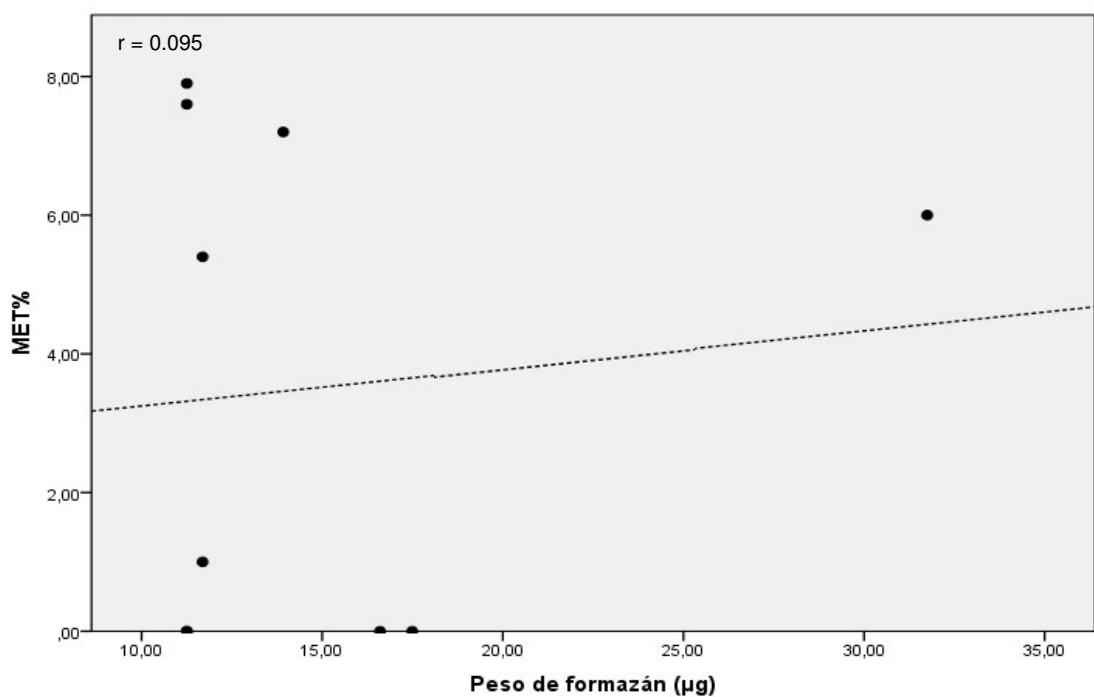


Figura 24. Correlación entre la movilidad espermática total y la cantidad generada de formazán en microgramos de 6 millones de espermatozoides correspondientes a espermatozoides de la temporada artificial post criopreservación.

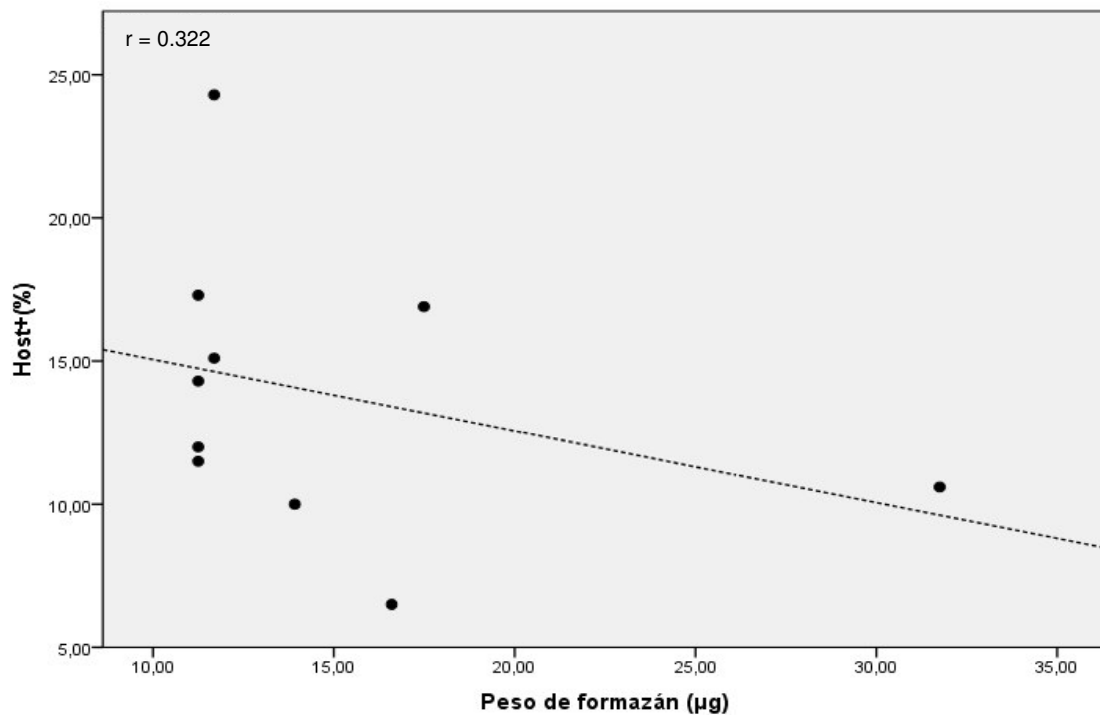


Figura 25. Correlación entre la integridad de membrana y la cantidad generada de formazán en microgramos de 6 millones de espermatozoides correspondientes a espermatozoides de la temporada artificial post criopreservación.

5.4.4 Parámetros espermáticos de los zánganos durante la temporada natural

Después de la criopreservación, los espermatozoides de zángano mostraron una movilidad con un valor mínimo de 0.99% del subgrupo 3 y subgrupo 1 de la Col. 2.N y Col. 6.N respectivamente y un valor máximo de 32.99% del subgrupo 1 de la Col. 8.N. Se observa un valor mínimo y máximo en la integridad de membrana que va de 1.96% a 42.64% en el subgrupo 2 de la Col. 2.N y del subgrupo 4 de la Col. 6.N respectivamente. Además, se presentó como parámetros espermáticos un MET % promedio de 13.25 ± 1.66 , un Host + (%) promedio de 19.66 ± 2.16 (Tabla 6).

Se determinó la correlación Pearson de pendiente positiva (Figura 26) entre el MET % y el Host + (%) donde se observa una moderada correlación, con un índice de correlación de 0.600 y un *p value* = 0.067 (Tabla 6).

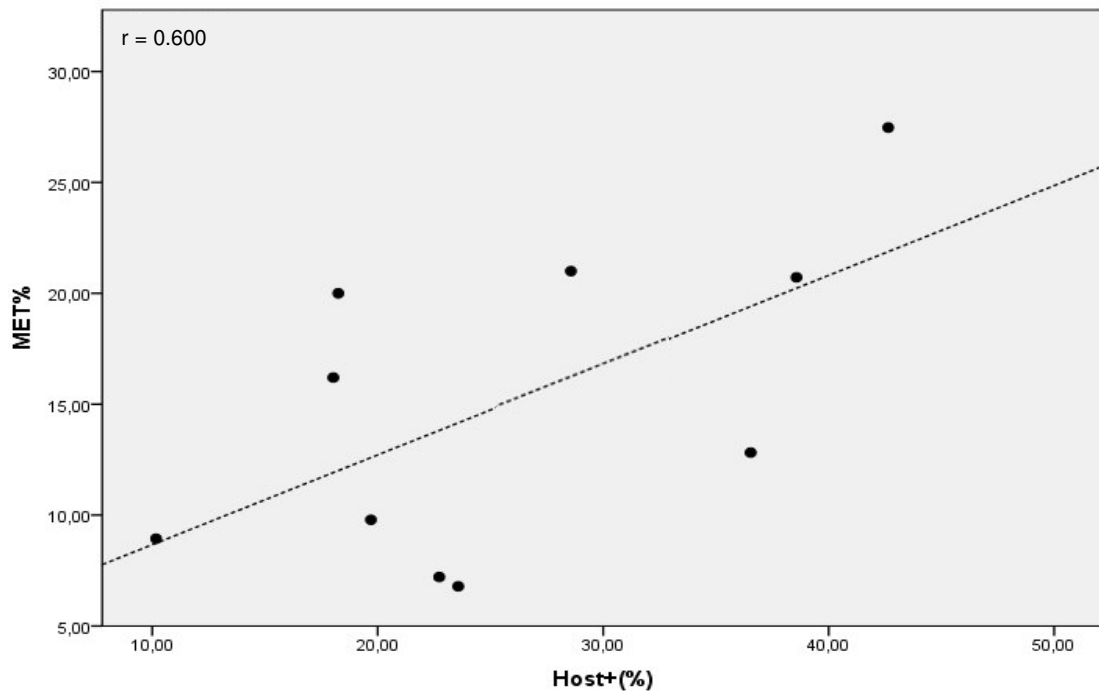


Figura 26. Correlación entre la movilidad espermática total y la integridad de membrana correspondiente a los espermatozoides de la temporada natural post criopreservación

5.4.5 Actividad mitocondrial de los espermatozoides de la temporada natural

La actividad mitocondrial post criopreservación de la temporada natural registró valor mínimo de 38.66% y un máximo de 84.76% en el subgrupo 2 de la Col. 1.N y subgrupo 4 de la Col. 5.N respectivamente (Tabla 7), con un promedio de las colonias de 64.45 ± 2.01 (Tabla 6). Además se presentó una baja correlación positiva entre la movilidad espermática total y los NBT positivos, siendo el índice R de 0.176 (Figura 27A), una media correlación positiva, siendo el índice R de 0.281 entre la actividad mitocondrial con la integridad de membrana (Figura 27B), y una media correlación negativa,

siendo el índice R de 0.292 entre la actividad mitocondrial y el peso de formazán (Figura 28), aunque no se aprecia una diferencia significancia entre

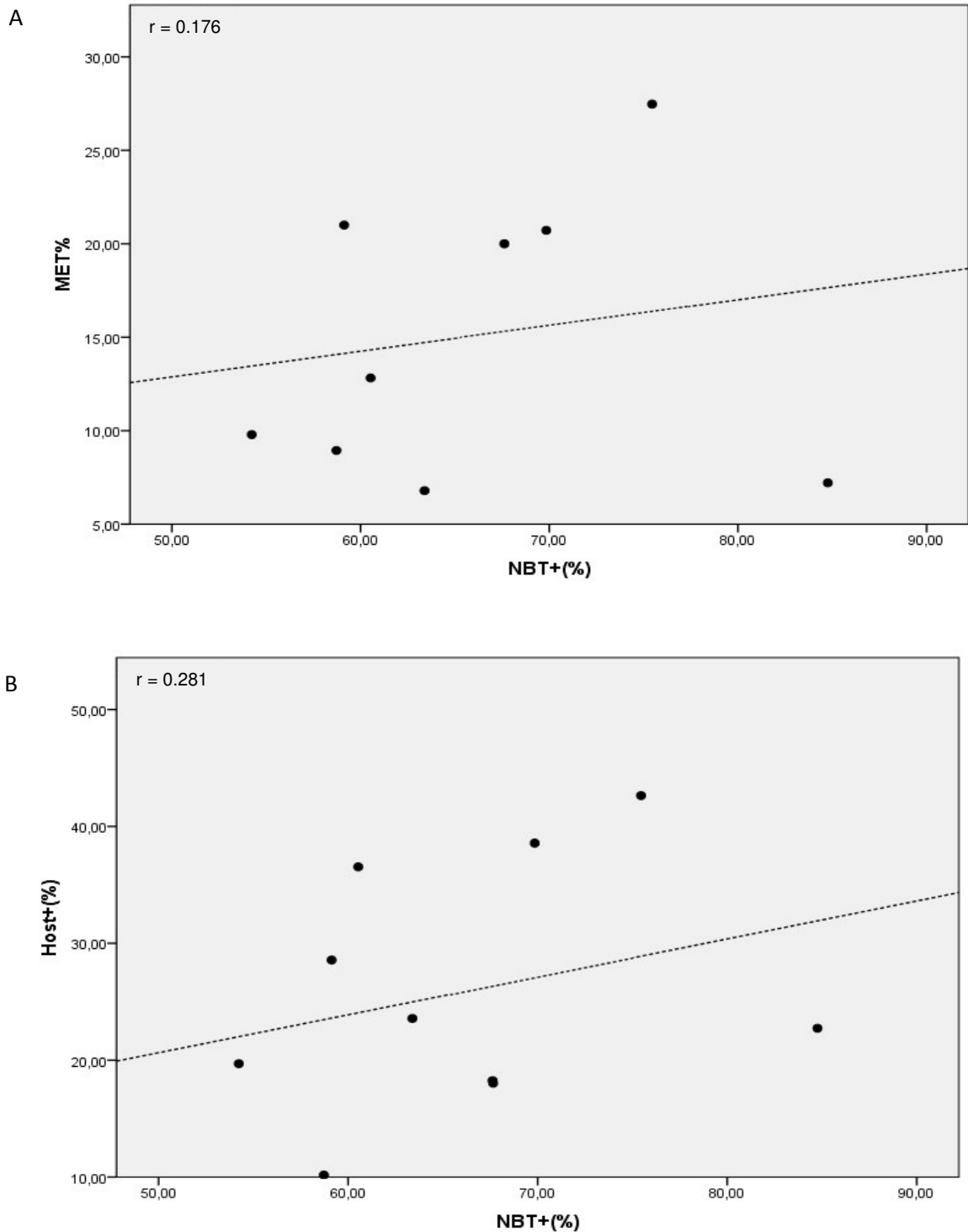


Figura 27. Gráficos de correlación correspondiente a los espermatozoides de la temporada natural post criopreservación. A) Correlación entre la movilidad espermática total y la actividad mitocondrial. B) Correlación entre la actividad mitocondrial y el índice de integridad de membrana.

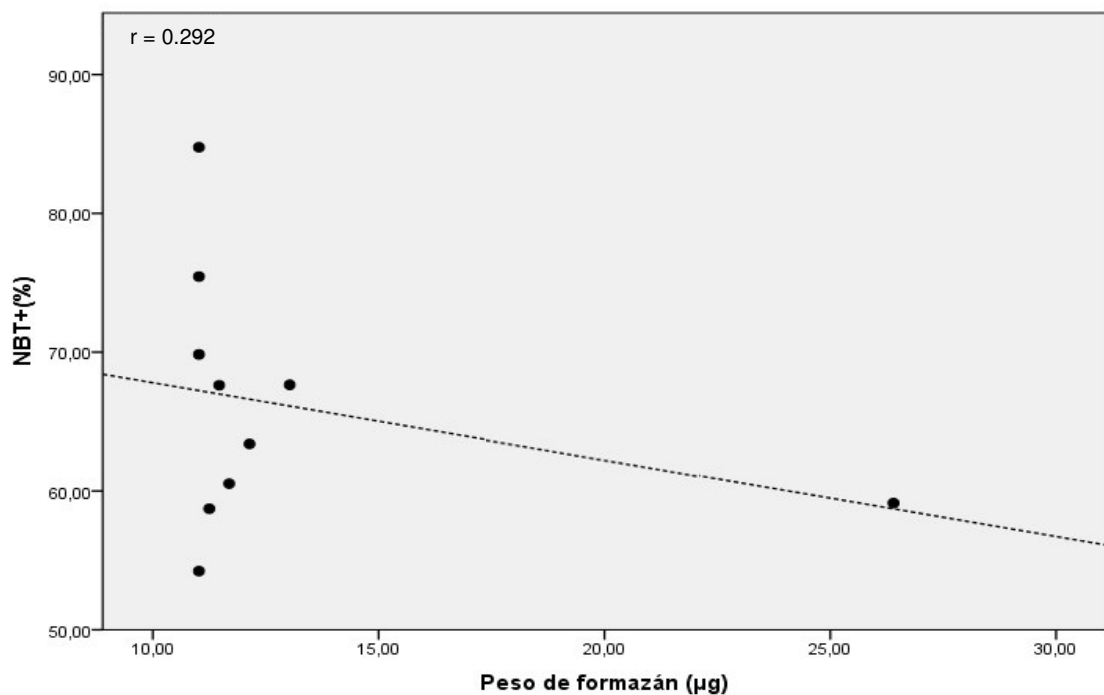


Figura 28. Correlación entre la actividad mitocondrial y la cantidad generada de formazán en microgramos de 6 millones de espermatozoides correspondiente a la temporada natural post criopreservación.

5.4.6 Estrés oxidativo de los espermatozoides de la temporada natural

Se registraron valores que van de 11.02 µg en los subgrupos 4 de la Col. 4.N, Col. 5.N, Col. 6.N y la Col. 8.N y un valor máximo de 26.40 µg en la Col. 2.N para los valores de estrés oxidativo (Tabla 7), con un promedio de las colonias de $13.01\% \pm 1.5$ (Tabla 6), además se presentó una media correlación positiva entre la movilidad espermática total y el peso de formazán, siendo el índice R de 0.276 (Figura 29A) y una baja correlación positiva, siendo el índice R de 0.055 entre la integridad de membrana con el peso de formazán (Figura 29B), aunque no se aprecia una significancia entre la correlación de estos índices de calidad espermática (Tabla 6).

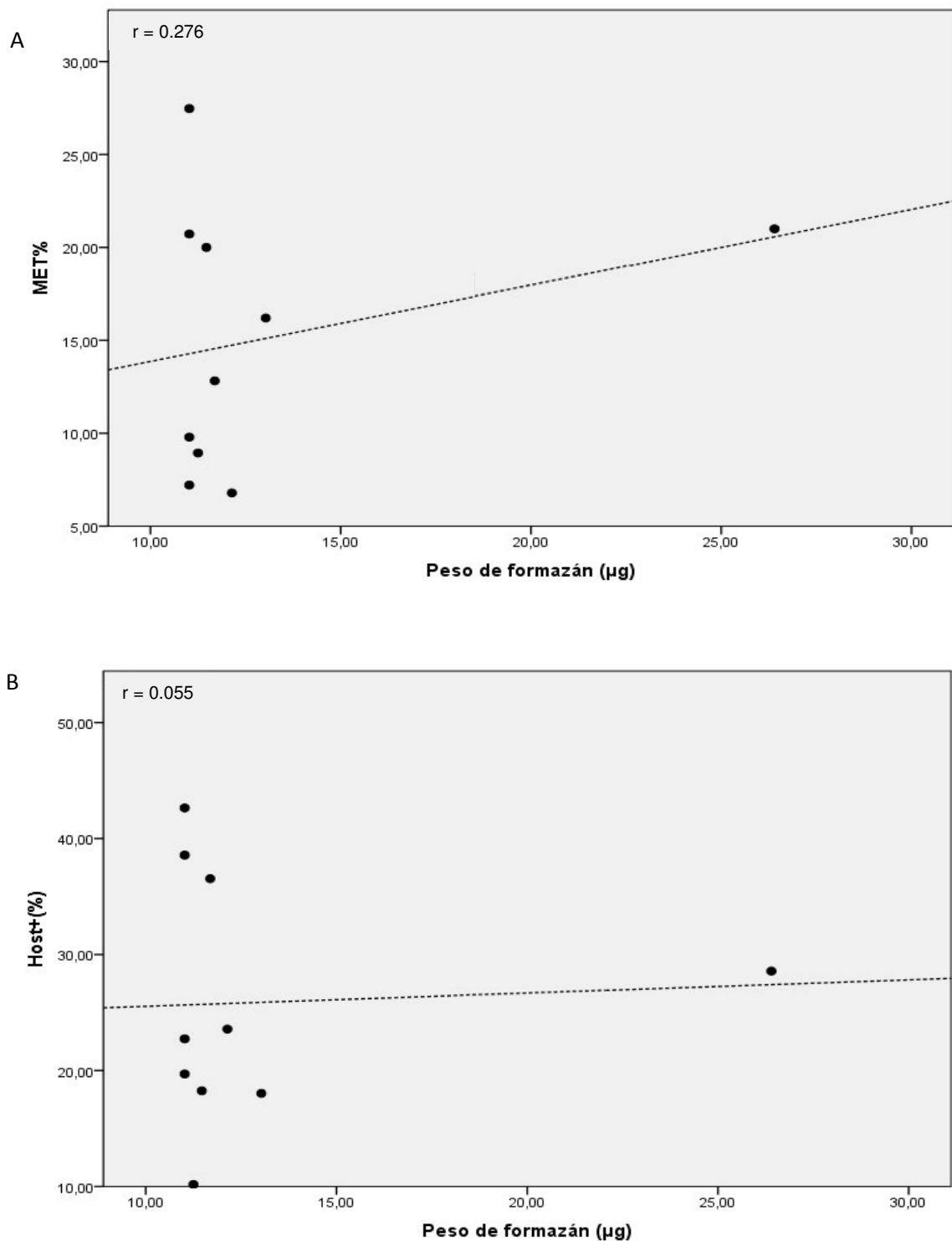


Figura 29. Gráficos de correlación correspondiente a los espermatozoides de la temporada natural post criopreservación. A) Correlación entre la movilidad espermática total y la cantidad generada de formazán en microgramos de 6 millones de espermatozoides. B) Correlación entre el índice de integridad de membrana y la cantidad generada de formazán en microgramos de 6 millones de espermatozoides.

5.5 Comparación de los parámetros espermáticos pre y post criopreservación en la temporada artificial y natural

5.5.1 Comparación de la movilidad espermática total de la temporada artificial

Fueron comparados los parámetros de movilidad espermática total de cada una de las colmenas pre y post criopreservación de la temporada artificial, hallándose una reducción significativa de la movilidad (Tabla 8), $p < 0.05$, se registró ausencia de la movilidad frente a la movilidad inicial en la Col.1.A, Col.4.A, Col.5.A y Col.9.A, observándose también un descenso brusco, superior al 75% con respecto a la movilidad inicial en la Col.6.A, Col. 7.A y Col. 10.A, mientras que la Col. 2.A, Col. 3.A y Col. 8.A mantuvieron una considerable movilidad, superior al 25%, frente a las medias iniciales como se observa en la Figura 30.

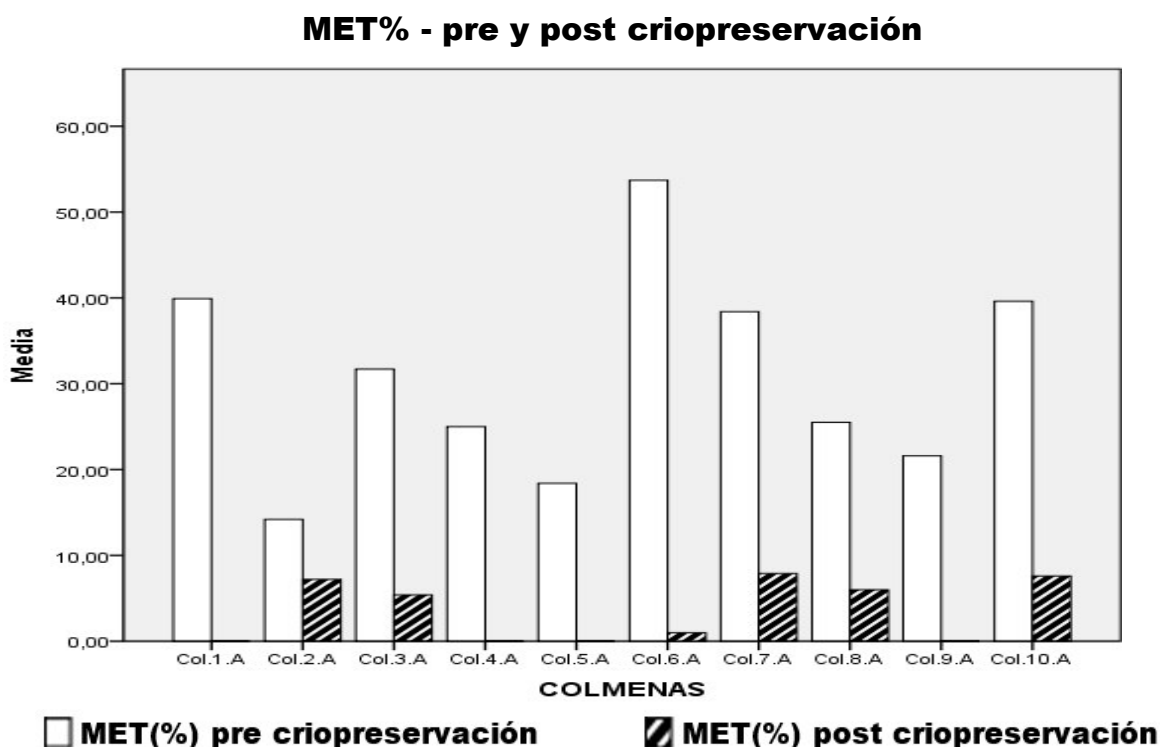


Figura 30. Gráfico de movilidad espermática total de la temporada artificial. Las barras blancas indican la media de la movilidad espermática total pre criopreservación, las barras sombreadas indican la media de la movilidad espermática total post criopreservación.

5.5.2 Comparación de la integridad de membrana de la temporada artificial

Fueron comparados los parámetros de integridad de membrana de cada una de las colmenas pre y post criopreservación de la temporada artificial, hallándose una reducción significativa (Tabla 8), aunque no tan brusco como en la movilidad espermática total, post criopreservación, $p < 0.05$, observándose descensos, superiores al 70% con respecto a la integridad de membrana inicial, en la Col. 1.A, Col. 2.A, Col. 4.A, Col. 6.A, Col. 7.A y Col. 10.A, mientras que la Col. 3.A, Col. 5.A, Col. 8.A y Col. 9.A mantuvieron una considerable integridad de membrana, superior al 30%, frente a las medias iniciales como se observa en la Figura 31.

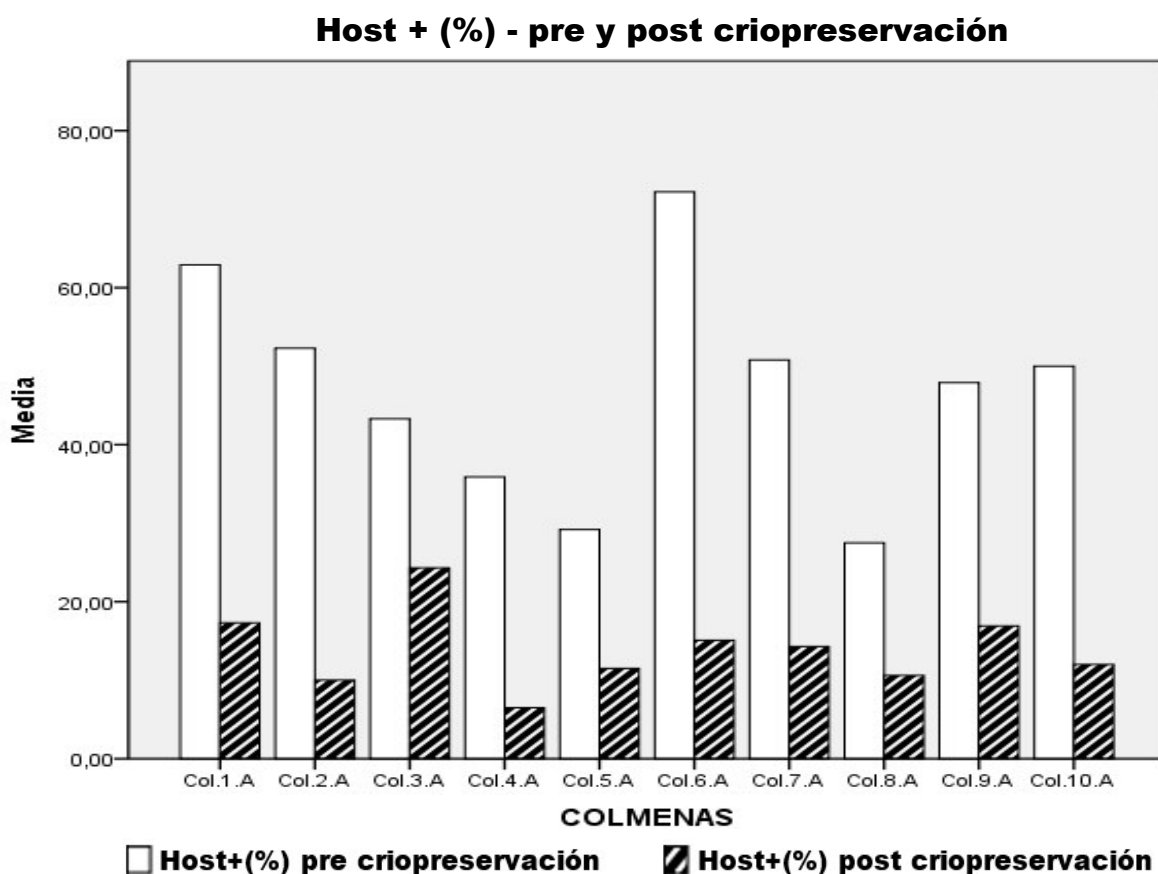


Figura 31. Gráfico de integridad de membrana de la temporada artificial. Las barras blancas indican la media de la integridad de membrana pre criopreservación, las barras sombreadas indican la media de la integridad de membrana post criopreservación.

5.5.3 Comparación de la actividad mitocondrial de la temporada artificial

Fueron comparados los parámetros de actividad mitocondrial de cada una de las colmenas pre y post criopreservación de la temporada artificial sin encontrarse una diferencia significativa (Tabla 8), entre ambos grupos post criopreservación $p > 0.05$, observándose descensos, inferiores al 50% con respecto a la actividad mitocondrial inicial, solo en la Col. 1.A, Col. 6.A, Col. 8.A, y Col. 9.A, mientras que las colmenas Col. 2.A, Col. 5.A y Col. 7.A se observó un considerable aumento en la actividad mitocondrial, frente a las medias iniciales como se observa en la Figura 32.

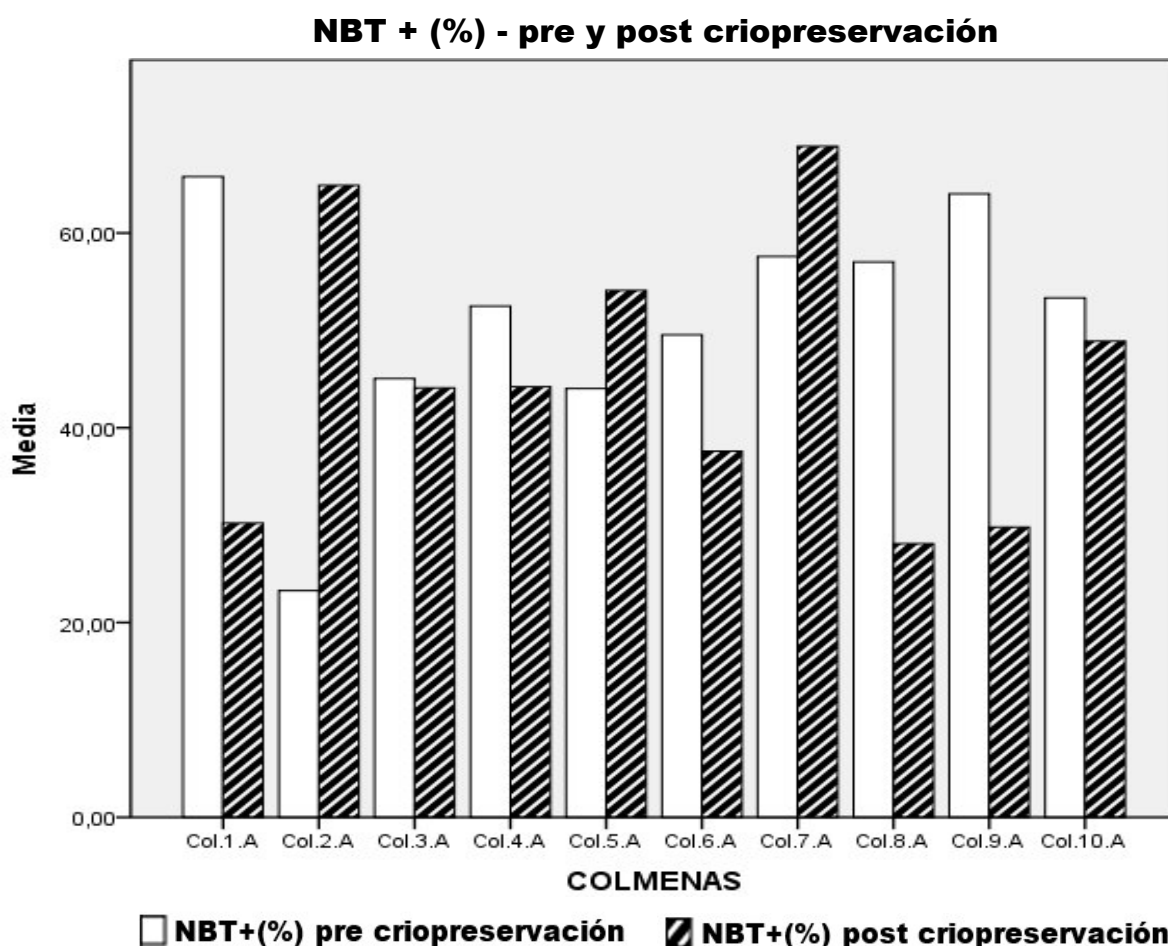


Figura 32. Gráfico de la actividad mitocondrial de la temporada artificial. Las barras blancas indican la media de la actividad mitocondrial pre criopreservación, las barras sombreadas indican la media de la actividad mitocondrial post criopreservación.

5.5.4 Comparación de los niveles de estrés oxidativo de la temporada artificial

Fueron comparados los pesos de sales de formazán generados de cada una de las colmenas pre y post criopreservación sin encontrarse una diferencia significativa (Tabla 8) post criopreservación, $p > 0.05$. Sin embargo, se mostró un aumento considerable con respecto a las sales de formazán generadas en la muestra inicial, de la Col. 8.A, mientras que fue observado solo un ligero aumento de este parámetro en las Col.4.A y Col.9.A frente a las medias iniciales como se observa en la Figura 33.

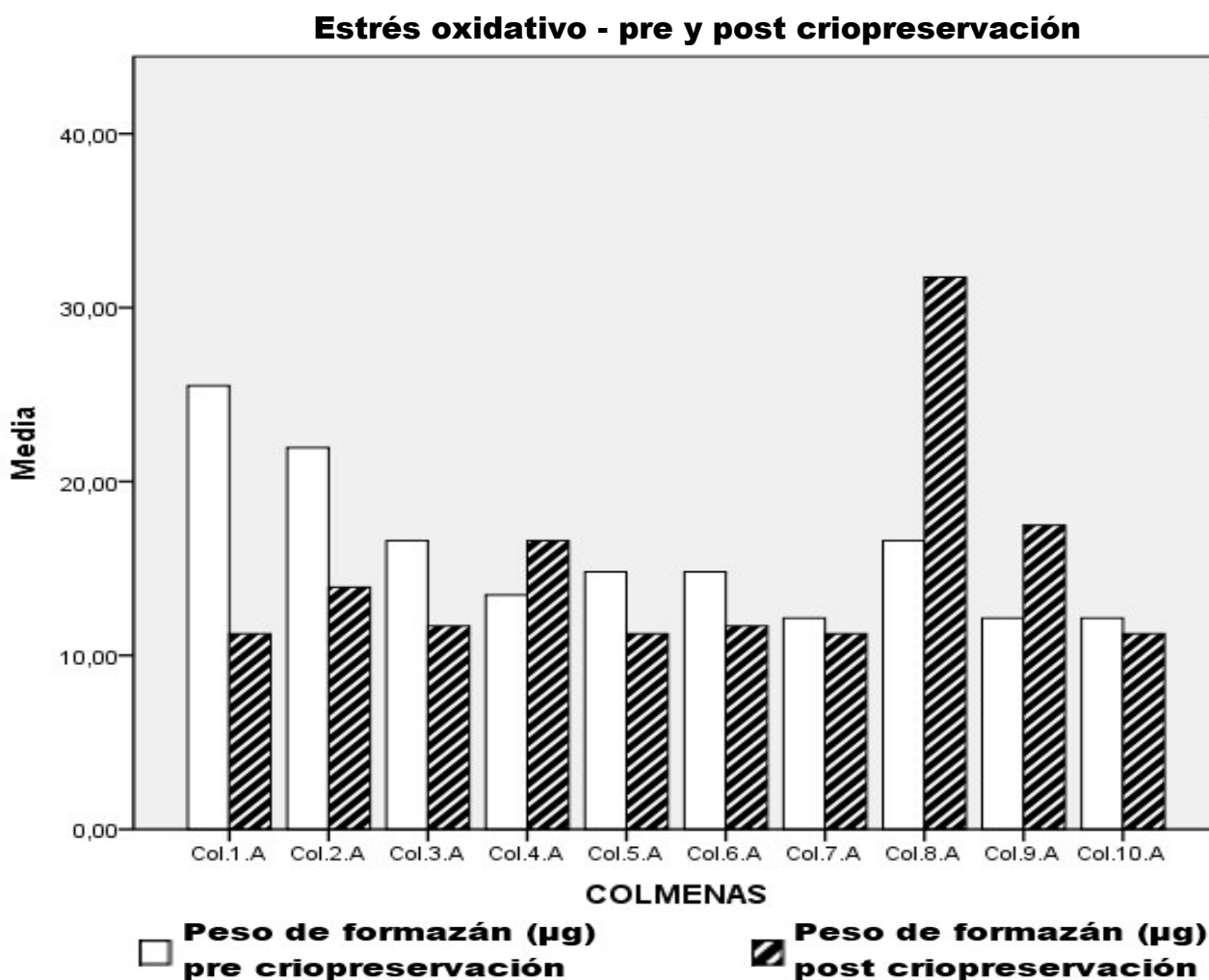


Figura 33. Gráfico de los pesos de formazán generados de la temporada artificial. Las barras blancas indican la media de los pesos de formazán generados pre criopreservación, las barras sombreadas indican la media de los pesos de formazán generados post criopreservación.

Tabla 8. Niveles de significancia entre las muestras pre y post criopreservación de la temporada artificial y natural.

	TEMPORADA ARTIFICIAL			TEMPORADA NATURAL		
	Pre criopreservación	Post criopreservación	<i>P value</i>	Pre criopreservación	Post criopreservación	<i>P value</i>
MET (%)	30.8 ± 3.8	3.5 ± 1.1	.005	48.79 ± 2.5	13.25 ± 1.66	.000
Host + (%)	47.2 ± 4.4	13 ± 1.5	.000	60.39 ± 2.34	19.66 ± 2.16	.000
NBT + (%)	51.2 ± 3.8	45.0 ± 4.5	.463	67.74 ± 2.29	64.45 ± 2.01	.497
W _{formazán}	16.0 ± 1.4	14.8 ± 2.0	.507	13.03 ± 0.82	13.01 ± 1.5	.240

Los valores de $p < 0.05$ poseen una diferencia estadísticamente significativa.

MET%: Movilidad espermática total

Host + (%): Integridad de membrana

NBT + (%): Actividad mitocondrial

W_{Formazán}: Peso de formazán

5.5.5 Comparación de la movilidad espermática total de la temporada natural

Fueron comparados los parámetros de movilidad espermática total de cada una de las colmenas pre y post criopreservación de la temporada natural hallándose un descenso significativo (Tabla 8) de la movilidad post criopreservación, $p < 0.05$, observándose una reducción no tan brusca como los de la temporada artificial, descensos superiores al 65% con respecto a la movilidad inicial, en la Col. 1.N, Col. 2.N, Col. 3.N, Col. 5.N y Col. 9.N mientras que las colmenas Col. 4.N, Col. 6.N, Col. 7.N, Col. 8.N y Col. 10.N mantuvieron una considerable movilidad, superior al 35%, frente a las medias iniciales como se observa en la Figura 34.

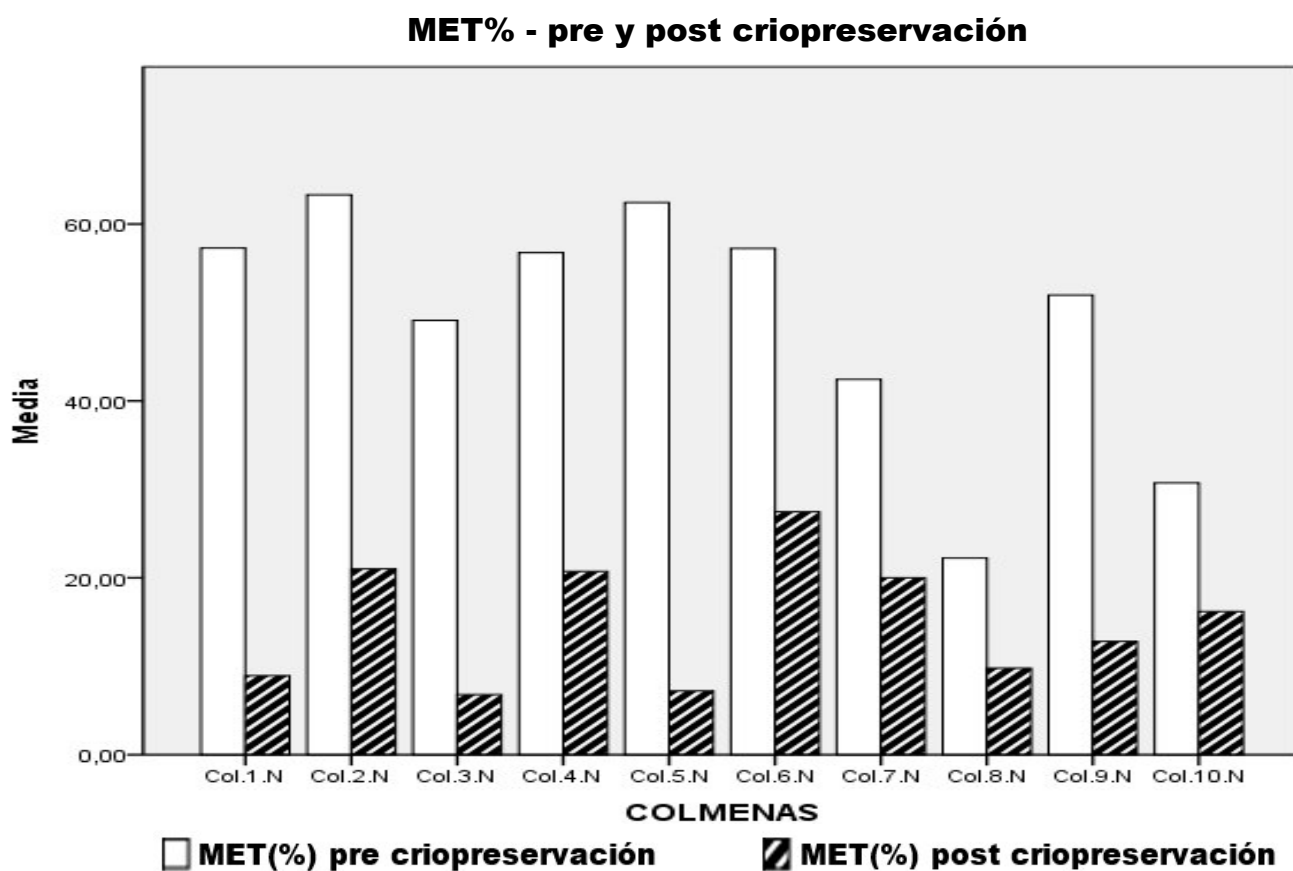


Figura 34. Gráfico de movilidad espermática total de la temporada natural. Las barras blancas indican la media de la movilidad espermática total pre criopreservación., las barras sombreadas indican la media de la movilidad espermática total post criopreservación.

5.5.6 Comparación de la integridad de membrana de la temporada natural

Fueron comparados los parámetros de integridad de membrana de cada una de las colmenas pre y post criopreservación de la temporada natural hallándose un descenso significativo (Tabla 8) post criopreservación, $p < 0.05$, observándose descensos, superiores al 70% con respecto a la integridad de membrana inicial, únicamente en la Col. 1.N, mientras que las otras colmenas de la misma temporada se mantuvo una considerable integridad de membrana, superior al 30%, frente a las medias iniciales como se observa en la Figura 35.

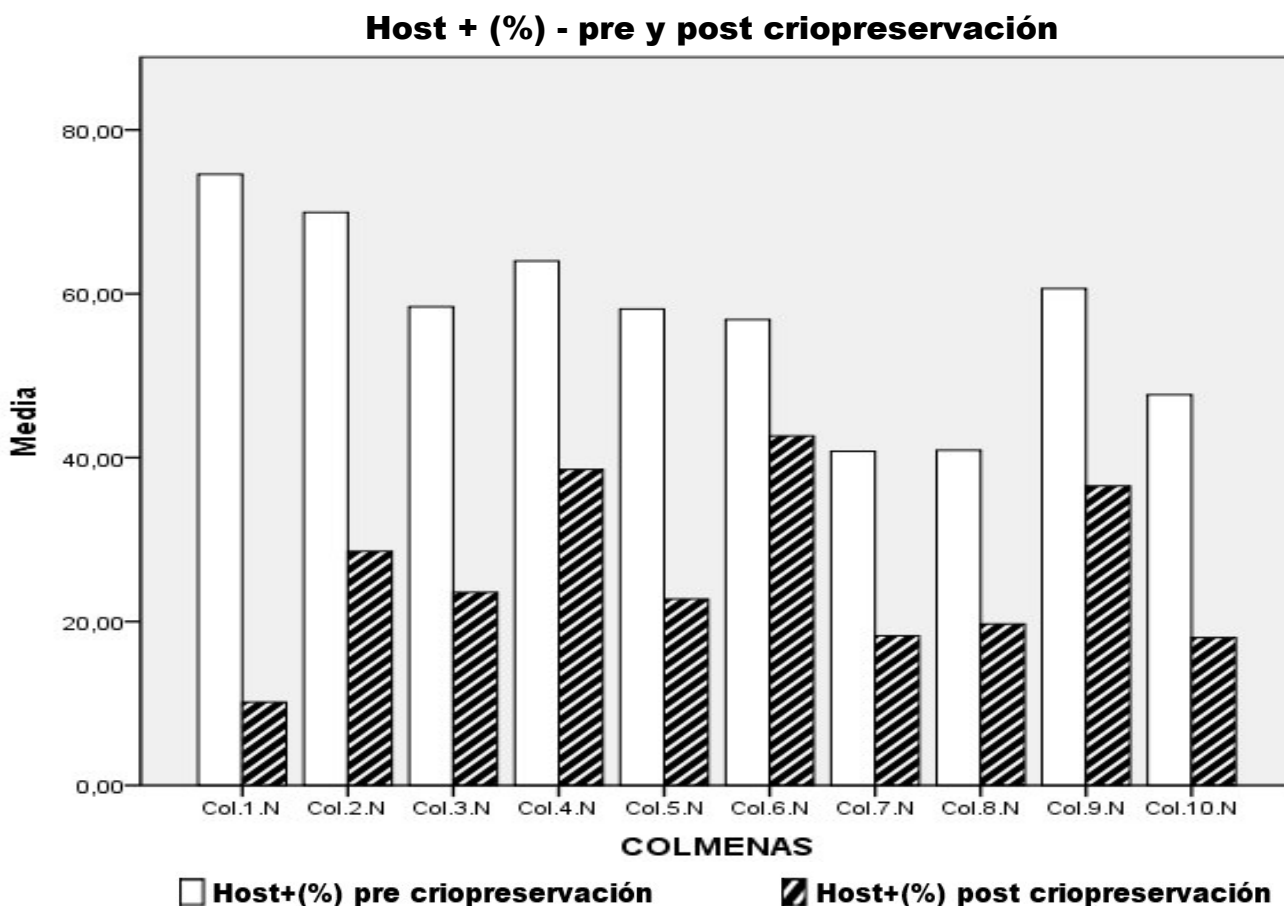


Figura 35. Gráfico de integridad de membrana de la temporada natural. Las barras blancas indican la media de la integridad de membrana pre criopreservación, las barras sombreadas indican la media de la integridad de membrana post criopreservación.

5.5.7 Comparación de la actividad mitocondrial de la temporada natural

Fueron comparados los parámetros de actividad mitocondrial de cada una de las colmenas pre y post criopreservación sin encontrarse una diferencia significativa (Tabla 8), entre ambos grupos post criopreservación, $p > 0.05$, observándose descensos, inferiores al 20% con respecto a la actividad mitocondrial inicial, solo en la Col. 1.N, Col. 3.N, Col. 8.N, Col. 9.N y Col. 10.N mientras que la Col. 2.N, Col. 4.N, Col. 5.N, Col. 6.N y Col. 7.N mostraron un ligero aumento en la actividad mitocondrial, frente a las medias iniciales como se observa en la Figura 36.

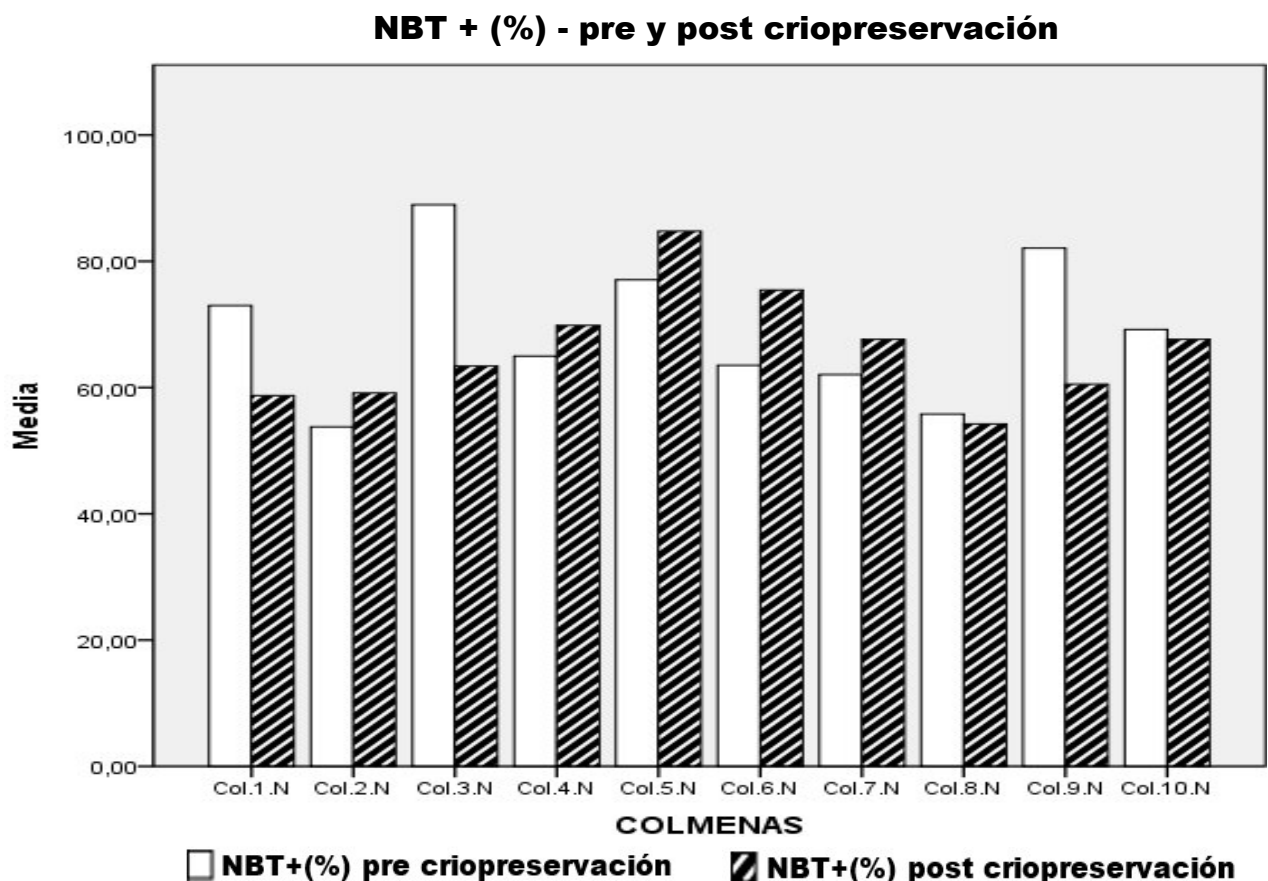


Figura 36. Gráfico de la actividad mitocondrial de la temporada natural. Las barras blancas indican la media de la actividad mitocondrial pre criopreservación, las barras sombreadas indican la media de la actividad mitocondrial post criopreservación.

5.5.8 Comparación de los niveles de estrés oxidativo de la temporada natural

Fueron comparados los pesos de sales de formazán generados de cada una de las colmenas pre y post criopreservación sin encontrarse una diferencia significativa (Tabla 8), entre ambos grupos post criopreservación, $p > 0.05$. Sin embargo, se mostró un aumento considerable frente a la muestra inicial, en la Col. 2N, mientras que fue observado solo un ligero aumento en la Col. 10N frente a las medias iniciales, una ligera reducción en la Col. 1.N, Col. 3.N, Col. 4.N, Col. 5.N, Col. 6.N y Col. 8.N y una reducción de hasta el 30% frente a la muestra inicial como se observa en la Figura 37.

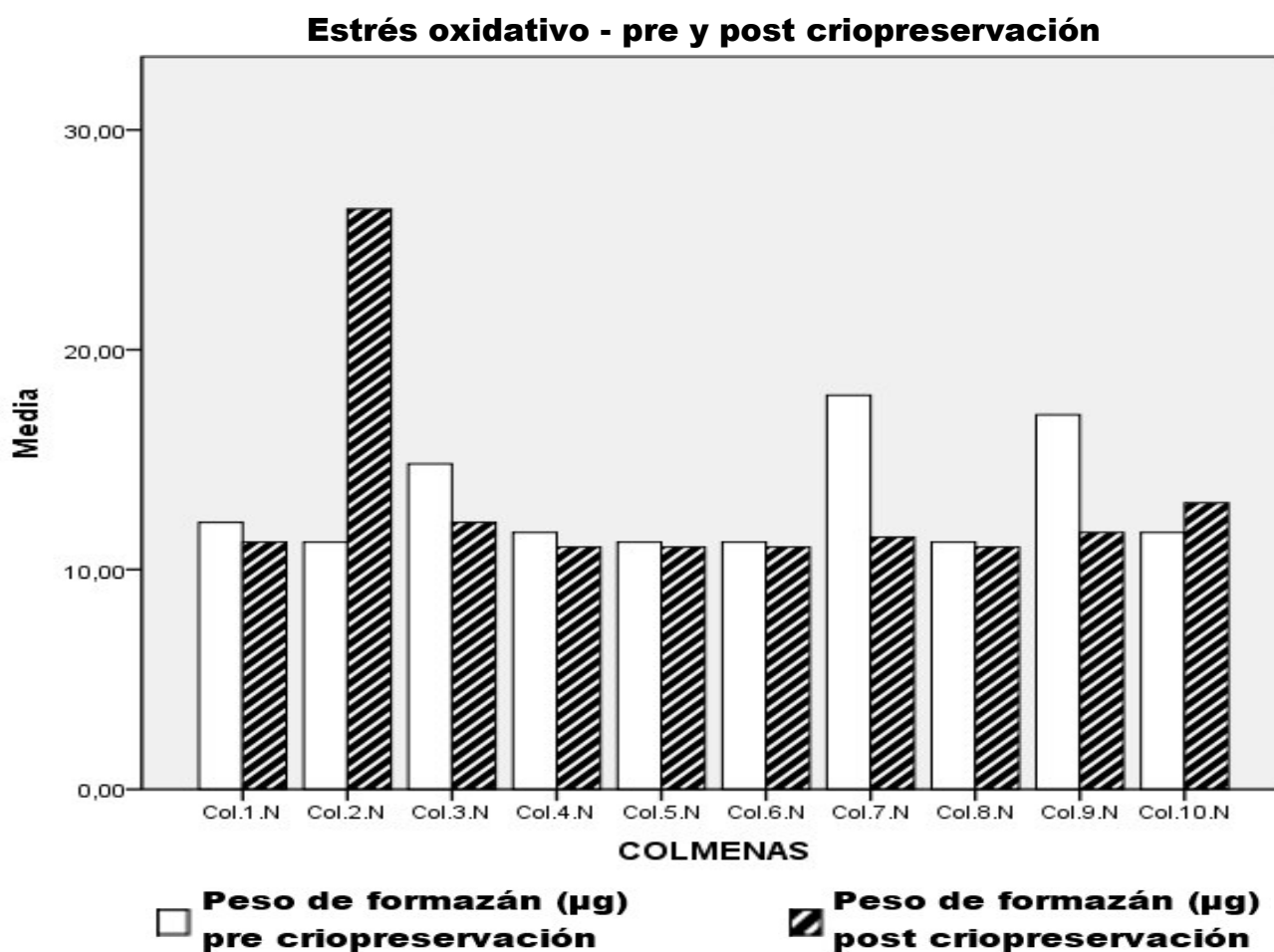


Figura 37. Gráfico de los pesos de formazán generados de la temporada natural. Las barras blancas indican la media de los pesos de formazán generados pre criopreservación, las barras sombreadas indican la media de los pesos de formazán generados post criopreservación.

5.6 Comparación de los parámetros espermáticos entre la temporada artificial y natural

Datos presentados las tablas 4 y 7 fueron usados para la comparación de los parámetros espermáticos pre criopreservación entre la temporada artificial y natural. Se registró una distribución normal en los parámetros de la concentración espermática, MET %, Host + (%) y NBT + (%) observándose diferencias significativas en los parámetros de movilidad espermática total y la actividad mitocondrial ($p < 0,05$), aunque no en la integridad de membrana ni en la concentración espermática ($p > 0,05$), mientras que los valores de estrés oxidativo mostraron una diferencia significativa entre las dos temporadas ($p < 0,05$), Tabla 9.

Por otro lado, se observó una distribución normal en los parámetros de Host + (%) y NBT + (%), luego de la comparación entre ambas temporadas post criopreservación, se registraron diferencias significativas en ambos parámetros ($p < 0,05$), mientras que los datos de MET % y estrés oxidativo que no cuentan con una distribución normal, mostraron una diferencia significativa únicamente en el estrés oxidativo (Tabla 10).

Tabla 9. Niveles de significancia entre la temporada artificial y natural de las muestras pre criopreservación.

	Concentración	MET (%)	Host + (%)	NBT + (%)	W _{Formazán}
<i>P value</i>	.472	.005	.097	.003	.035

Los valores de $p < 0.05$ poseen una diferencia estadísticamente significativa.

MET%: Movilidad espermática total

Host + (%): integridad de membrana

NBT + (%): actividad mitocondrial

W_{Formazán}: Peso de formazán

Tabla 10. Niveles de significancia entre la temporada artificial y natural de las muestras post criopreservación.

	MET (%)	Host + (%)	NBT + (%)	W _{Formazán}
<i>P value</i>	.168	.004	.001	0.001

Los valores de $p < 0.05$ poseen una diferencia estadísticamente significativa.

MET%: Movilidad espermática total

Host + (%): integridad de membrana

NBT + (%): actividad mitocondrial

W_{Formazán}: Peso de formazán

VI. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

La espectrofotometría es una técnica empleada en distintas ramas de la biotecnología con la finalidad de la cuantificación de compuestos en suspensión homogénea, lo que permite determinar la cantidad de dicho compuesto en un volumen definido. En diferentes ensayos de evaluación de la actividad de las coenzimas NADH o NADPH fueron empleadas sales de tetrazolium por su actividad oxido reductora con la finalidad de cuantificar la generación de sales de formazán cuya absorbancia es considerada más sensible que la medición del NADH o NADPH (Zhu et al., 2011). Además, las sales de tetrazolium son utilizadas en la detección de ROS como el $O_2^{\cdot -}$ y el H_2O_2 , de gran capacidad reductora y asociados a una alta incidencia de peroxidación lipídica en la cabeza del espermatozoide, permitiendo cuantificar los niveles de estrés oxidativo en células como los espermatozoides y otros tipos celulares (Tvrdá et al., 2015).

Las curvas de calibración diseñadas previamente, utilizaron sales de formazán obtenidas a partir del sistema de reducción xantina oxidasa (Tunc et al., 2010), bases fuertes como el KOH 2M para la lisis celular, DMSO como líquido orgánico en la resuspensión de dichas sales y la cuantificación de estas utilizando lectores de microplacas de ELISA (Tunc et al., 2010; Tvrdá et al., 2016). Protocolos previos determinaron longitudes de onda que van desde 530 nm (Mercado-Pichardo et al., 1981) a 620 nm (Sim et al., 2006) en la determinación de la producción de formazán, lo que sugiere una longitud intermedia entre éstas como la longitud de 570nm utilizada en nuestro estudio y en el trabajo presentado por (Tvrdá et al., 2016).

En ese ensayo se emplearon agentes poco estables como el H_2O_2 y el O_3 para la reducción de NBT frente al sistema de reducción xantina oxidasa propuesto por Tunc et al., en el año 2010, y se obtuvo suficiente cantidad de sales de formazán para realizar la experimentación, mientras que la recuperación y purificación de sales de formazán se realizaron por una variante de lo descrito por Tunc et al., 2010. El líquido orgánico

utilizado para la resuspensión de sales de formazán fue el etanol absoluto en lugar del DMSO, mientras que la lisis celular se realizó por ciclos de sonicación y lisis con KOH 2M. Por otro lado, la lectora de micro-placas de ELISA fue remplazada por un espectrofotómetro manteniendo la longitud de onda de 570nm (Tvrdá et al., 2016) debido a que tienen el mismo principio en el uso de la luz. Los resultados no mostraron diferencia significativa entre los métodos de lisis celular utilizados, lo que sugiere que los ciclos empleados son suficientes para la liberación de la totalidad de sales de formazán como lo hace el KOH 2M.

El medio de resuspensión juega un papel muy importante dentro del mantenimiento de las características fisiológicas de los espermatozoides, aportando sales, proteínas, carbohidratos y antibióticos necesarios. Sin embargo, el empleo de sustancias exógenas aumenta de forma notable la producción de ROS, elementos como Fe^{2+} y Cu^{2+} promueven la generación de radicales libres a partir de peróxidos (Chihuailaf et al., 2002), por lo que compuestos como el medio HAM F-10, que poseen contenido de hierro aumentan la tasa de LPO en las muestras espermáticas (Huszar & Vigue, 1994).

Por otro lado, la suplementación con una fracción de BSA equivale a una reducción de los niveles oxidantes del HAM - F10 por las propiedades antioxidante con las que cuenta la albumina (Vásquez et al., 2014); entre las cuales está el grupo sulfidrido de la cisteína (Cys 34) que atrapa el radical hidroxilo formando ácido sulfénico (RSOH) concediendo la capacidad de unión a iones metálicos como el Cu^{2+} y Fe^{2+} (Roche et al., 2008), disminuyendo así la disponibilidad de estos iones para participar en reacciones generadoras de radicales libres como la reacción de Fenton, en la cual se forma el radical hidroxilo (Guérin et al., 2001).

Trabajos previos reportan una media del MET% de hasta 79.0% (Ciereszko et al., 2017), además se describe una variación de la calidad espermática de vesículas seminales de zánganos individuales, con rangos entre los 83 a 100% de células viables (Collins &

Pettis, 2001), del mismo modo fueron reportados registros de 79.3% de espermatozoides vivos recolectado a partir de la disección de las vesículas seminales (Collins et al., 2004) y una viabilidad de hasta 67.0% en espermatozoides obtenidos por presión abdominal (Fisher II & Rangel, 2018), mostrando una alta correlación de los parámetros mencionados en todos los estudios. Para zánganos de *Apis mellifera* fueron halladas grandes variaciones en la concentración espermática, con recuentos que varían de $4,0 \times 10^6$ (Rinderer et al., 1999) hasta 11.9×10^6 espermatozoides (Schlüs et al., 2003). En este trabajo se determinó los parámetros antes mencionados observando una deficiencia en la calidad espermática, 50% y el 69% en la MET % para la temporada artificial y natural, respectivamente frente a trabajos publicados antes del 2004 (Collins & Pettis, 2001; Collins et al., 2004), y valores similares o ligeramente inferiores a trabajos recientes, atribuyendo esta causa a factores ambientales y medio ambientales (Pardee, 2018), como a la exposición de ciertos compuestos químicos (Gül et al., 2017).

Por otro lado, la actividad mitocondrial, registrada en nuestro estudio para espermatozoides de *Apis mellifera*, empleando el método de óxido reducción diseñado por Hrudka, 1979 registran una media de 51.2% y al 60,4% en las temporadas artificial y natural respectivamente frente a la media de 80% reportado por Ciereszko et al., (2017), mostrando en ambos resultados una correlación positiva de la MET% con la actividad mitocondrial para ambas temporadas como se observa también en otras: mamíferos (Ferramosca et al., 2012 & Guo et al., 2017), aves (Kamali et al., 2016) y peces (Berríos et al., 2010).

La determinación de los niveles de estrés oxidativo viene siendo cuantificada en diferentes investigaciones como la detección de la quimioluminiscencia inducida por el luminol (Aitken et al., 1995 & Agarwal et al., 2003), siendo el método más común de detección, sin embargo, esta medición de la frecuencia es dinámica, por lo que posiblemente no refleje con precisión los niveles de ROS debido a la vida media muy corta de los radicales (Sikka, 1996). Para tales evaluaciones, la cantidad de ROS

detectada, en lugar de la generación de ROS representará una evaluación fisiológica de estrés oxidativo como las reacciones en las que participa el nitroblue tetrazolium (NBT) (Sikka, 1996).

Los niveles de estrés oxidativo descritos en este trabajo para espermatozoides de zángano muestran una correlación inversa entre éste con los parámetros de MET%, integridad de membrana y actividad mitocondrial tal como lo describe Berríos (2010) para otras especies, esto se debe particularmente a que los espermatozoides son susceptibles a los efectos dañinos de ROS. La membrana celular de éstos, contiene grandes cantidades de ácidos grasos insaturados, que pueden oxidarse fácilmente trayendo como consecuencia la peroxidación lipídica de la membrana espermática, inactivación de las enzimas celulares, daño estructural del DNA y apoptosis celular (Agarwal et al., 2004; Aitken et al., 2010).

Los niveles más altos de estrés oxidativo encontrados en este trabajo corresponden a los zánganos de la temporada artificial de la región Junín indicando una posible inmadurez de los espermatozoides ligada a alteraciones en los eventos espermatogénéticos (Evenson et al., 2000), en trabajos previos se encontró una variación significativa en la producción de ROS para subconjuntos de diferentes etapas de desarrollo, esto estaría ocasionando un daño oxidativo por los espermatozoides inmaduros a los espermatozoides maduros (Henkel R. & Schill W., 1998; Agarwal et al., 2003), siendo característico de la morfología deteriorada, principalmente con residuos citoplasmáticos que indican su inmadurez y potencial de fertilidad reducido (Gomez, 1996; Aziz et al., 2004) en comparación a los zánganos producidos en la temporada natural.

El buen resultado de la criopreservación de espermatozoides de zángano es afectado por factores exógenos tales como: la presión osmótica, la concentración del agente crioprotector, la relación de dilutor y diluyente, el enfriamiento y el estrés oxidativo que

podiera generar la criopreservación, así como la tasa de congelamiento lento, éste último muy importante debido al efecto que tiene sobre la membrana espermática pre y post criopreservación (Barbas & Mascarenhas, 2009). Trabajos previos indican que la variación de la integridad de la membrana plasmática generada por el enfriamiento y calentamiento causa el desarreglo de los lípidos dentro de la membrana durante la criopreservación (Akhoondi et al., 2011 y Emamverdi et al., 2013), reduciendo la fluidez de la membrana (Giraud et al., 2000). Los factores endógenos como el tamaño y la edad del zángano, la calidad del semen, pequeños volúmenes de semen, dificultades para la colección de espermatozoides, así como el estrés oxidativo inherente a los espermatozoides son considerados también como características básicas para el éxito en la criopreservación (Dadkhah et al., 2016). Trabajos de investigación en otras especies muestran que existe una diferencia significativa entre los parámetros de movilidad e integridad de membrana luego de la criopreservación (O'Connell et al., 2002). Debido a que los factores exógenos fueron superados utilizando la patente creada por (Valdivia & Temoche, 2016) los resultados de la criopreservación esperados se reducen únicamente a la calidad reproductiva de los espermatozoides.

En este trabajo fueron determinados los parámetros post criopreservación, observando una media en MET% del 3.5% y del 13.25% en la temporada artificial y natural respectivamente, atribuyendo esta causa a la resistencia de los espermatozoides de esta región y a la cantidad de cantidad de espermatozoides no funcionales que están presentes en las muestras de espermatozoides iniciales (Martinez-Alborcia et al., 2012), siendo la media del MET%, 30.8 ± 3.8 y la media del Host + (%), 47.2 ± 4.4 en la temporada artificial y 48.79 ± 2.5 y 60.39 ± 2.34 respectivamente en la temporada natural, influyendo negativamente en la criopreservación. De acuerdo a la patente registrada por (Valdivia & Temoche, 2016), los resultados post criopreservación varían dependiendo de la calidad inicial de la muestra, observándose una media de la MET de 71,43% en algunos grupos y de 9,2%, 17,5% y 28,0% en otros, aunque los valores de

la integridad de membrana post criopreservación no son menores al 85,36% en ninguno de los grupos. Martinez-Alborcia et al., 2012, explica que la cantidad exagerada de espermatozoides no funcionales está relacionada a la cantidad de ROS generada por esas mismas muestras espermáticas, más aún si superan el 50% de espermatozoides no funcionales.

La actividad mitocondrial registro una media de 45.0% en la temporada artificial y una media de 64.45% en la temporada natural, y una media de 14.8% y 13.01% en los niveles de estrés oxidativo de la temporada artificial y natural respectivamente post criopreservación en contraposición a lo postulado por O'Connell et al., 2002, lo que sugiere que la concentración de crioprotector, presión hiposmótica así como tasa de enfriamiento no influyen negativamente en las funciones mitocondriales ni de la generación de ROS en los espermatozoides descongelados. Gadea et al., (2004) sugieren que una reducción de la viabilidad durante la criopreservación, podría deberse a una disminución de las defensas dadas por los antioxidantes, sin embargo, éstas podrían ser contrarrestadas luego de la inseminación por el contenido de enzimas como la catalasa (CAT), glutatión S-transferasa (GST) y superóxido dismutasa (SOD) encontradas en la espermoteca de la reina (Weirich et al., 2002).

La evaluación de los parámetros espermáticos fue estudiada en los espermatozoides de zánganos de la AAA-AP donde no se lograron encontrar diferencias significativas de la viabilidad de las muestras pre criopreservadas entre las temporadas, aunque en ciertas colmenas si existían espermatozoides con una mayor viabilidad que en otras como describe (Fisher II & Rangel, 2018). Los resultados también muestran un reducido nivel de viabilidad de los espermatozoides de zángano en ambas temporadas frente a otros reportes en donde la viabilidad inicial promedio de hasta 80% o más (Johnson et al., 2013). La diferencia entre estos dos grupos podría deberse a la temporada de colecta de los zánganos, mientras que en la temporada artificial, los zánganos fueron colectados

en los meses diciembre y enero del 2017, la temporada natural o reproductiva en el distrito de Pichanaki es generalmente los meses de setiembre y octubre, por lo que la colecta de los zánganos no se llevó a cabo en las condiciones más óptimas para su calidad reproductiva que está basada en la disponibilidad y abundancia de recursos (Rangel et al., 2013). Otro factor potencial para obtener una baja viabilidad de los espermatozoides de la primera temporada podría deberse a la presencia de pesticidas en las colmenas muestreadas, pesticidas como los agroquímicos introducidos inadvertidamente en la colmena luego de la polinización que reducen la fuerza vital de la colmena (Rangel et al., 2013, Smith et al., 2014; Fisher II A. & Rangel J., 2018). Un estudio reciente sobre los efectos de los insecticidas de uso común, reveló que éstos afectan negativamente la salud reproductiva de los zánganos (Straub et al., 2016).

De acuerdo a los resultados presentados en la tabla 9, el aumento significativo de los niveles de estrés oxidativo podría deberse más a factores externos y ambientales (Gül et al., 2017; Fisher, 2018) que al nivel de madurez sexual de los espermatozoides (Agarwal et al., 2003), esto debido a que no existe una diferencia de la concentración espermática, índice de madurez sexual, entre temporadas (Miller et al., 1997). Ya que está confirmado el uso de pesticidas y la exposición a herbicidas en los apiarios de la AAA-AP (Anexo 7), la baja calidad reproductiva puede tener en estos factores, una explicación más robusta que la generación artificial de zánganos. Por otro lado los resultados de la tabla 10 muestran que el efecto de la criopreservación es menor en la temporada natural, pero que los factores externos hacen más sensibles a los espermatozoides al protocolo de criopreservación, más aun en la movilidad, un estudio similar demostró el impacto negativo de los alimentos contaminados en la movilidad y actividad mitocondrial de espermatozoides de zánganos (Ciereszko et al., 2017), lo que sugiere que la naturaleza del herbicida o miticidas puede afectar un parámetro más que a otro.

VII. CONCLUSIONES

- Existe una correlación positiva entre la MET% y la actividad mitocondrial tanto en la temporada artificial como en la temporada natural.
- La actividad mitocondrial, así como los niveles del estrés oxidativo en los espermatozoides de zángano de los apiarios de la AAA-AP no se ven afectados por el proceso de criopreservación.
- La calidad espermática no es la ideal para la criopreservación en la mayoría de las colmenas de la AAA-AP.
- La concentración y la viabilidad en los espermatozoides de zángano de los apiarios de la AAA-AP no son alterados frente a la generación artificial de éstos a comparación de los otros parámetros evaluados.
- Es posible acondicionar un ensayo de detección bioquímica para la evaluación del estrés oxidativo pre y post criopreservación de espermatozoides de *Apis mellifera*.

VIII. RECOMENDACIONES

- Reducir las variables perjudiciales como la exposición a herbicidas y miticidas en los zánganos de la AAA-AP para mejorar su calidad espermática.
- Hacer un seguimiento de las colmenas y el control de su exposición al glifosato y a miticidas para el control de varroa.
- Criar colmenas sin exposición a pesticidas y miticidas para reconocer con precisión el nivel de impacto de los factores ambientales con mayor alcance.
- Conservar mediante criopreservación únicamente los espermatozoides de zánganos producidos en temporadas naturales.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abdelkader, F., Kairo, G., Tchamitchian, S., Cousin, M., Senechal, J., Crauser D., Vermandere J., Alaux C., Conte Y., Belzuncees L., Barbouche N. & Brunet J. (2014) Semen quality of honey bee drones maintained from emergence to sexual maturity under laboratory, semi-field and field conditions. *Apidologie* 45 (2), 215–223.
- Adgaba, N., Al-Ghamdi, A., Shenkute, A. G., Ismaiel, S., Al-Kahtani, S., Tadess, Y., Ansari J.M., Abebe W. & Abdulaziz, M. Q. A. (2014). Socio-economic analysis of beekeeping and determinants of box hive technology adoption in the Kingdom of Saudi Arabia. *J. Anim. Plant Sci*, 24(6), 1876-1884.
- Agarwal, A., Saleh, R. A., & Bedaiwy, M. A. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and sterility*, 79(4), 829-843.
- Agarwal, A., Nallella, K. P., Allamaneni, S. S., & Said, T. M. (2004). Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. *Reproductive biomedicine online*, 8(6), 616-627.
- Aitken, R. J., Paterson, M., Fisher, H., Buckingham, D. W., & Van Duin, M. (1995). Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *Journal of Cell Science*, 108(5), 2017-2025.
- Aitken, R. J., De Iuliis, G. N., Finnie, J. M., Hedges, A., & McLachlan, R. I. (2010). Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. *Human Reproduction*, 25(10), 2415-2426.
- Akhoondi, M., Oldenhof, H., Stoll, C., Sieme, H., & Wolkers, W. F. (2011). Membrane hydraulic permeability changes during cooling of mammalian cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1808(3), 642-648.

- Aliakbari, F., Gilani, M. A. S., Amidi, F., Baazm, M., Korouji, M., Izadyar, F., Yazdekhesti H. & Abbasi, M. (2016). Improving the efficacy of cryopreservation of spermatogonia stem cells by antioxidant supplements. *Cellular Reprogramming (Formerly "Cloning and Stem Cells")*, 18(2), 87-95.
- Aziz, N., Saleh, R. A., Sharma, R. K., Lewis-Jones, I., Esfandiari, N., Thomas, A. J., & Agarwal, A. (2004). Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertility and sterility*, 81(2), 349-354.
- Bailey J.L. & Berube B. (1998). Mechanisms of cryopreservation-induced capacitation of bovine sperm. *Journal of Andrology*. 20:13.
- Barbas, J. P., & Mascarenhas, R. D. (2009). Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and tissue banking*, 10(1), 49-62.
- Baumber, J., Ball, B. A., Linfor, J. J., & Meyers, S. A. (2003). Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Andrology*, 24(4), 621-628.
- Bedford S.J., Varner D.D. & Meyers S.A. (2000). Effects of cryopreservation on the acrosomal status of stallion spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*. Suppl 56:133-140
- Beirão, J., Zilli, L., Vilella, S., Cabrita, E., Schiavone, R., & Herráez, M. P. (2012). Improving sperm cryopreservation with antifreeze proteins: effect on gilthead seabream (*Sparus aurata*) plasma membrane lipids. *Biology of reproduction*, 86(2).
- Berríos, O., Valdebenito, I., Treulén, F., & Ubilla, A. (2010). Almacenamiento en frío de espermatozoides de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*): Efectos en la motilidad, superóxido intracelular, integridad de la membrana plasmática y

- potencial de membrana mitocondrial. Archivos de medicina veterinaria, 42(3), 179-186.
- Bermúdez. L., Temoche, H., Flores K., Ramos E.; Romero S., Uipan P. & Valdivia, M. (2006). Determinación del volumen de dilutor para la criopreservación de espermatozoides de abeja, *Apis mellifera*. [Abstract]. Libro de resúmenes de la XV Reunión Científica ICBAR-FCB-UNMSM.
 - Bilodeau, J. F., Chatterjee, S., Sirard, M. A., & Gagnon, C. (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Molecular reproduction and development*, 55(3), 282-288.
 - Blokhina O., Virolainen E. & Fagerstedt K. (2003). Antioxidants, Oxidative Damage and Oxygen Deprivation Stress: a Review. *Annals of botany* 91:179-194.
 - Buhr M.M., Curtis E.F. & Kakuda N.S. (1994). Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology*. 31:224-238
 - Cadenas E. (1997). Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem*; 58:79-110.
 - Carabajal Paladino, L., Lo Nostro, F., Papeschi, A., Cladera, J., & Bressa, M. J. (2017). Spermatogenesis in the parasitoid *Diachasmimorpha longicaudata* (Hymenoptera: Braconidae). *Acta Zoologica*, 98(1), 38-43.
 - Cárdenas R. N. & Pedraza, C.J. (2006). Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación química*; 17(2):164-173.
 - Céspedes Miranda E., & Castillo Herrera J. (2008). La peroxidación lipídica en el diagnóstico del estrés oxidativo del paciente hipertenso: Realidad o mito. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 27(2), 0-0.
 - Chian, R. C., & Quinn, P. (Eds.). (2010). *Fertility cryopreservation*. Cambridge University Press.

- Chihuailaf, R. H., Contreras, P. A., & Wittwer, F. G. (2002). Patogénesis del estrés oxidativo: consecuencias y evaluación en salud animal. *Veterinaria México*, 33(3).
- Ciereszko, A., Wilde, J., Dietrich, G. J., Siuda, M., Bąk, B., Judycka, S., & Karol, H. (2017). Sperm parameters of honeybee drones exposed to imidacloprid. *Apidologie*, 48(2), 211-222.
- Collins, A. M., & Pettis, J. S. (2001). Effect of varroa infestation on semen quality. *American Bee Journal*, 141(8), 590.
- Collins, A. M., Williams, V., & Evans, J. D. (2004). Sperm storage and antioxidative enzyme expression in the honey bee, *Apis mellifera*. *Insect molecular biology*, 13(2), 141-146.
- Dadkhah, F., Nehzati-Paghaleh, G., Zhandi, M., Emamverdi, M., & Hopkins, B. K. (2016). Preservation of honey bee spermatozoa using egg yolk and soybean lecithin-based semen extenders and a modified cryopreservation protocol. *Journal of Apicultural Research*, 55(4), 279-283.
- Dasi, R. (2016). Sperm vitrification. *Revista Asociación para el Estudio de la Biología de la Reproducción*. Vol. 21 N° 1, 16-21.
- Du Plessis S., Makker K., Desai N. & Agarwal A. (2008) The impact of oxidative stress on in vitro fertilization. *Expert Review Of Obstetrics & Gynecology* 3(4),539–554.
- Elejalde Guerra, J. (2001). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. In *Anales de medicina interna* (Vol. 18, No. 6, pp. 50-59). Arán Ediciones, SL.
- Emamverdi, M., Zhandi, M., Zare Shahneh, A., Sharafi, M., & Akbari-Sharif, A. (2013). Optimization of Ram Semen Cryopreservation Using a Chemically

Defined Soybean Lecithin-Based Extender. *Reproduction in Domestic Animals*, 48(6), 899-904.

- Ernster, L. (1993). Lipid peroxidation in biological membranes: mechanisms and implications. Active oxygens, lipid peroxides, and antioxidants.
- Espinoza, J., Schulz, M., Sanchez, R. & Villegas, J. (2009) Integrity of mitochondrial membrane potential reflects human sperm quality. *Andrologia* 41 (1), 51– 54
- Esteves, S. C., Sharma, R. K., Thomas Jr, A. J., & Agarwal, A. (1998). Cryopreservation of human spermatozoa with pentoxifylline improves the post-thaw agonist-induced acrosome reaction rate. *Human reproduction* (Oxford, England), 13(12), 3384-3389.
- Evenson, D. P., Jost, L. K., Corzett, M., & Balhorn, R. (2000). Characteristics of human sperm chromatin structure following an episode of influenza and high fever: a case study. *Journal of andrology*, 21(5), 739-746.
- Fahy GM., (1986). The relevance of cryoprotectant "toxicity" to cryobiology. *Cryobiology*. 23: 1-13.
- Ferramosca, A., Provenzano, S. P., Coppola, L., & Zara, V. (2012). Mitochondrial respiratory efficiency is positively correlated with human sperm motility. *Urology*, 79(4), 809-814.
- Fisher II A. & Rangel J. (2018). La exposición a pesticidas durante el desarrollo afecta negativamente la viabilidad de los espermatozoides de abejas (*Apis mellifera*). *PloS one* , 13(12), e0208630.
- Ford, W. C. L. (2004). Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Human reproduction update*, 10(5), 387-399.

- Fraczek, M., & Kurpisz, M. (2005). The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej* (Online), 59, 523-534.
- Fraser L, Strzezek R & Strzeżek J. (2007). Fertilizing capacity of boar semen frozen in an extender supplemented with ostrich egg yolk lipoprotein fractions - a pilot study. *Pol J Vet Sci.* 10: 131-135.
- Gadea J, Selles E, Marco MA, Coy P, Matas C, Romar R. 2004. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*; 62(3-4):690-701.
- Gałęcka, E., Jacewicz, R., Mrowicka, M., Florkowski, A., & Gałęcki, P. (2008). Antioxidative enzymes--structure, properties, functions. *Polski Merkuriusz Lekarski: Organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*, 25(147), 266-268.
- Gao D., Liu J., Liu C., McGann L., Watson P., Kleinhans F., Mazur P., Critser E. & Critser J. (1995). Prevention of osmotic injury to human spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum Reprod.* 10: 1109-1122.
- Giraud, M. N., Motta, C., Boucher, D., & Grizard, G. (2000). Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Human Reproduction*, 15(10), 2160-2164.
- Gómez, A. T. (2016). Mecanismos de adaptación de la actividad mitocondrial en respuesta a estrés (Doctoral dissertation).
- Gómez, E., Buckingham, D. W., Brindle, J., Lanzafame, F., Irvine, D. S., & Aitken, R. J. (1996). Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *Journal of andrology*, 17(3), 276-287.

- Gray, J. E., Starmer, J., Lin, V. S., Dickinson, B. C., & Magnuson, T. (2013). Mitochondrial hydrogen peroxide and defective cholesterol efflux prevent in vitro fertilization by cryopreserved inbred mouse sperm. *Biology of reproduction*, 89(1).
- Guerin, P., El Mouatassim, S., & Menezo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human reproduction update*, 7(2), 175-189.
- Gül, A., Şahinler, N., Onal, A. G., Hopkins, B. K., & Sheppard, W. S. (2017). Effects of diluents and plasma on honey bee (*Apis mellifera* L.) drone frozen-thawed semen fertility. *Theriogenology*, 101, 109-113.
- Guo, H., Gong, Y., He, B., & Zhao, R. (2017). Relationships between mitochondrial DNA content, mitochondrial activity, and boar sperm motility. *Theriogenology*, 87, 276-283.
- Henkel, R., & Schill, W. B. (1998). Sperm separation in patients with urogenital infections. *Andrologia*, 30(S1), 91-97.
- Hicks, J. J., Torres-Ramos, Y. D., & Sierra-Vargas, M. P. (2006). Estrés oxidante. Concepto y clasificación. *Revista de Endocrinología y nutrición*, 14(4), 223-226.
- Hogarth, C. A., & Griswold, M. D. (2010). The key role of vitamin A in spermatogenesis. *The Journal of clinical investigation*, 120(4), 956-962.
- Holt, W. V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53(1), 47-58.
- Hrudka, F. (1979). Cytochemistry of oxidoreductases in spermatozoa: The technique revisited. *Andrologia*, 11(5), 337-353.
- Hung, K., Kingston, J., Albrecht, M., Holway, D. & Kohn, J. (2018). La importancia mundial de las abejas como polinizadores en hábitats naturales. *Proc. R. Soc. B*, 285(1870), 20172140.

- Hunter, F. M., & Birkhead, T. R. (2002). Sperm viability and sperm competition in insects. *Current Biology*, 12(2), 121-123.
- Huszar, G., & Vigue, L. (1994). Correlation between the rate of lipid peroxidation and cellular maturity as measured by creatine kinase activity in human spermatozoa. *Journal of andrology*, 15(1), 71-77.
- Isachenko, V., Maettner, R., Petrunkina, A. M., Sterzik, K., Mallmann, P., Rahimi, G., Sanchez R., Risopatron J., Damjanoski I. & Isachenko, E. (2012). Vitrification of human ICSI/IVF spermatozoa without cryoprotectants: new capillary technology. *Journal of andrology*, 33(3), 462-468.
- Jerlick A., Pitt A., Schaur R. & Spickett C. (2000). Pathway of phospholipid oxidation by HOC1 in human LDL, detected by LC-MS. *Free Radic Biol Med*; 28(5):673-82.
- Jeyendran R., Van Der Ven, Perez –Pelaez M., Crabo B. & Zaneveld D. (1984). Development an assay to asses the funtional integrity of the human sperm membrane and its relationships to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertil.* 7: 219-224
- Johnson, R. M., Dahlgren, L., Siegfried, B. D., & Ellis, M. D. (2013). Effect of in-hive miticides on drone honey bee survival and sperm viability. *Journal of Apicultural Research*, 52(2), 88-95.
- Kairo, G., Biron, D. G., Abdelkader, F. B., Bonnet, M., Tchamitchian, S., Cousin, M., Dussaubat C., Benoit B., Kretzschmar A., Belzunces L. & Brunet, J. L. (2017). *Nosema ceranae*, Fipronil and their combination compromise honey bee reproduction via changes in male physiology. *Scientific reports*, 7(1), 8556.
- Kamali Sangani, A., Masoudi, A. A., & Vaez Torshizi, R. (2016). Association of mitochondrial function and sperm progressivity in slow-and fast-growing roosters. *Poultry science*, 96(1), 211-219.

- Kothari, S., Thompson, A., Agarwal, A., & du Plessis, S. S. (2010). Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function.
- Lähdetie, J. (1995). Occupation-and exposure-related studies on human sperm. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 37(8), 922-930.
- Lensky, Y., Ben-David, E., & Schindler, H. (1979). Ultrastructure of the spermatozoon of the mature drone honeybee. *Journal of apicultural research*, 18(4), 264-271.
- Lino-Neto, J., Báo, S. N., & Dolder, H. (2000). Sperm ultrastructure of the honey bee (*Apis mellifera*)(L)(Hymenoptera, Apidae) with emphasis on the nucleus-flagellum transition region. *Tissue and Cell*, 32(4), 322-327.
- Maalaps, K. (2014) Sperm management in honey bees: Counting sperm on honey bee eggs to measure queen fertility. (Tesis de Maestría). Estonian University Of Life Sciences. Tartu, Estonia.
- Mallok, A., Flores-Sánchez, R. M., Alonso-Rodríguez, C. Á., & Martínez-Sánchez, G. (2011). Desbalance redox en la infertilidad masculina. *Revista Cubana de Farmacia*, 45(2), 283-296.
- Martinez-Alborcia, M. J., Valverde, A., Parrilla, I., Vazquez, J. M., Martinez, E. A., & Roca, J. (2012). Detrimental effects of non-functional spermatozoa on the freezability of functional spermatozoa from boar ejaculate. *PLoS One*, 7(5), e36550.
- Mao, W., Schuler, M. & Berenbaum, M. (2015). Un fitoquímico de la dieta altera la expresión de genes asociados con la casta en las abejas. *Avances científicos* , 1 (7), e1500795.
- Mazur P. (1984). Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am J Physiol*. 247: C125-C142.

- Mercado-Pichardo, E., Vilar-Rojas, C., Wens-Flores, M. & Bernal-Torres, A. (1981). Reduction capacity on nitroblue tetrazolium (NBT) of the normal human spermatozoa. *Archivos de investigacion medica*, 12(1), 107-114.
- Metz, B. & Tarpy, D. (2019). Senescencia reproductiva en drones de la abeja (*Apis mellifera*). *Insectos*, 10 (1), 11.
- Michener, C. D. (2000). *The bees of the world* (Vol. 1). JHU press.
- Miller, L. L., Whitsett, J. M., Vandenberg, J. G., & Colby, D. R. (1977). Physical and behavioral aspects of sexual maturation in male golden hamsters. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 91(2), 245.
- Ministerio de Agricultura. (2011). Propuesta del plan nacional de desarrollo apícola. Comisión multisectorial de naturaleza temporal, adscrita al Ministerio de Agricultura encargada de elaborar la propuesta de plan nacional de desarrollo apícola resolución suprema N° 156-2011-PCM. Recuperado de <http://agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/informacion-especializada/2012/propuestaapicola.pdf>
- Núñez Sellés, A. J. (2011). Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. *Revista Cubana de Salud Pública*, 37, 644-660.
- O'connell, M., McClure, N., & Lewis, S. E. M. (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*, 17(3), 704-709.
- Oliver M., Ruiz T., Tarazona A. & Giraldo C. (2006). El espermatozoide, desde la eyaculación hasta la fertilización. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, Vol. 19:4, 11.
- Palacín, I., Vicente-Fiel, S., Santolaria, P., & Yániz, J. L. (2013). Standardization of CASA sperm motility assessment in the ram. *Small ruminant research*, 112(1-3), 128-135.

- Palma, G. A. (2001). Biotecnología de la reproducción. Ed. INTA. Argentina. p. 1-19.
- Paoli, D., Gallo, M., Rizzo, F., Baldi, E., Francavilla, S., et al. (2011) Mitochondrial membrane potential profile and its correlation with increasing sperm motility. *Fertil. Steril.* 95 (7), 2315–2319.
- Pardee, G. L. (2018). Effects of Climate Change on Plants, Pollinators, and Their Interactions.
- Pfeifer, H., Conrad, M., Roethlein, D., Kyriakopoulos, A., Brielmeier, M., Bornkamm, G. W., & Behne, D. (2001). Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *The FASEB Journal*, 15(7), 1236-1238.
- Pfeiffer T., Schuster S. & Bonhoeffer S. (2001). Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science*. 292:504-7.
- Plante, M., de Lamirande, E., & Gagnon, C. (1994). Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertility and sterility*, 62(2), 387-393.
- Pommer A., Rutllant J. & Meyers S., (2003). Phosphorylation of Protein Tyrosine Residues in Fresh and Cryopreserved Stallion Spermatozoa under Capacitating Conditions, *Biology of Reproduction*. 68, 1208–1214.
- Ponce de León C., (2014). Estrés oxidativo y antioxidantes en la conservación espermática en ratón. Facultad de Ciencias Experimentales. Universidad de Jaén. España.
- Rangel, J., Keller, J. J., & Tarpy, D. R. (2013). The effects of honey bee (*Apis mellifera* L.) queen reproductive potential on colony growth. *Insectes sociaux*, 60(1), 65-73.
- Renard P. & Cochard J. (1989). Effects of various cryoprotectants on Pacific oyster *Crassostrea gigas* Thunberg, Manila clam *Ruditapes philippinarum*

- Reeve and King scallop *Pecten maximus* embryos. Influence of the biochemical and effects. *Cryo- Letters*, 10: 169-180.
- Rhodes, J., Harden, S., Spooner-Hart, R., Anderson, D. & Wheen, G. (2010) Effects of age, season and genetics on semen and sperm production in *Apis mellifera* drones. *Apidologie* 42(1), 29–38.
 - Rinderer, T. E., De Guzman, L. I., Lancaster, V. A., Delatte, G. T., & Stelzer, J. A. (1999). Varroa in the mating yard. I. The effects of *Varroa jacobsoni* and apistan on drone honey bees. *American bee journal* (USA).
 - Riva, N., López, C., Martínez, G., Laizzo, R., Artola, M. & Ruhlmann, C. (2016). Análisis comparativo del congelamiento lento y la vitrificación para la criopreservación de espermatozoides. *Reproducción*, 31, 7-14.
 - Roche, M., Rondeau, P., Singh, N. R., Tarnus, E., & Bourdon, E. (2008). The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS letters*, 582(13), 1783-1787.
 - Rosato, M. & Laffaldano, N. (2013). Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. *Theriogenology*, 79(3), 508-516.
 - Rothschild, L. (1955). The spermatozoa of the honey-bee. *Ecological Entomology*, 107(1-14), 289-294.
 - Sailer, B. L., Jost, L. K., & Evenson, D. P. (1995). Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. *Journal of andrology*, 16(1), 80-87.
 - Sakkas, D., Moffatt, O., Manicardi, G. C., Mariethoz, E., Tarozzi, N., & Bizzaro, D. (2002). Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biology of reproduction*, 66(4), 1061-1067.

- Salas, R. (2000). Manual de apicultura para el manejo de abejas africanizadas. Programa para el desarrollo de la pequeña y mediana industria apícola en Honduras. Honduras. EAP-Zamorano, 65.
- Saleh R.A., Agarwal, A., Kandirali, E., Sharma, R. K., Thomas, A. J., Nada, E. A., Evenson D. P. & Alvarez, J. G. (2002). Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. Fertility and sterility, 78(6), 1215-1224.
- Santos, Y. F., López, R. F., & López, C. G. (2003). Análisis económico del sector apícola en Castilla y León: evolución reciente y perspectivas. In 8º Congreso de Economía Regional de Castilla y León: Comunicaciones: Valladolid, días 28, 29 y 30 de noviembre de 2002 (pp. 194-214). Consejería de Economía y Hacienda.
- Schlüns, H., Schlüns, E., Praagh, J. & Moritz, R. (2003) Sperm numbers in drone honeybees (*Apis mellifera*) depend on body size. *Apidologie* 34(6), 577–584.
- Sekiné, K., Furusawa, T., & Hatakeyama, M. (2015). The boule gene is essential for spermatogenesis of haploid insect male. *Developmental biology*, 399(1), 154-163.
- Sikka, S. (1996). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience*, 1, e78-86.
- Silveira P. (2016). Estudio de la función mitocondrial espermática humana. Tesis de maestría. Universidad de la Republica. Montevideo, Uruguay.
- Sim Choi, H., Woo Kim, J., Cha, Y. N., & Kim, C. (2006). A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 27(1), 31-44.
- Smith, M. L., Ostwald, M. M., Loftus, J. C., & Seeley, T. D. (2014). A critical number of workers in a honeybee colony triggers investment in reproduction. *Naturwissenschaften*, 101(10), 783-790.

- Straub, L., Villamar-Bouza, L., Bruckner, S., Chantawannakul, P., Gauthier, L., Khongphinitbunjong, K., Retschnig G., Troxler A., Vidondo B., Neumann P. & Williams, G. R. (2016). Neonicotinoid insecticides can serve as inadvertent insect contraceptives. *Proc. R. Soc. B*, 283(1835), 20160506.
- Suleiman, S. A., Ali, M. E., Zaki, Z. M. S., El-Malik, E. M. A., & Nasr, M. A. (1996). Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *Journal of andrology*, 17(5), 530-537.
- Thibier, M. (1990). New biotechnologies in cattle reproduction. In 7th Congress of the Federation of Asian Veterinary Associations (FAVA), Chonburi (Thailand), 4-7 Nov 1990.
- Thonneau, P., Bujan, L., Multigner, L., & Mieusset, R. (1998). Occupational heat exposure and male fertility: a review. *Human Reproduction* (Oxford, England), 13(8), 2122-2125.
- Tofilski, A., Chuda-Mickiewicz, B., Czekońska, K. & Chorbiński, P. (2012) Flow cytometry evidence about sperm competition in honey bee (*Apis mellifera*). *Apidologie* 43 (1), 63–70.
- Tunc, O., Thompson, J., & Tremellen, K. (2010). Development of the NBT assay as a marker of sperm oxidative stress. *International journal of andrology*, 33(1), 13-21.
- Tvrdá, E., Kováčik, A., Tušimová, E., Massányi, P., & Lukáč, N. (2015). Resveratrol offers protection to oxidative stress induced by ferrous ascorbate in bovine spermatozoa. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 50(14), 1440-1451.
- Tvrdá, E., Kováčik, A., Tušimová, E., Paál, D., Mackovich, A., Alimov, J., & Lukáč, N. (2016). Antioxidant efficiency of lycopene on oxidative stress-induced damage in bovine spermatozoa. *Journal of animal science and biotechnology*, 7(1), 50.

- Ugalde, J. R. (2014). Biotecnologías reproductivas para el siglo XXI. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48(1), 33-34.
- Valdivia M. & Temoche H. (2016). Método de congelamiento en espermatozoides de zánganos con aplicación en la industria apícola. Registro de Propiedad intelectual, Título N° 7863. INDECOPI.
- Vásquez, N. A., Torres, V., & Rojano, B. A. (2014). Efecto del Ácido Ascórbico durante Maduración In Vitro de Oocitos Bovinos en la Producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) y Competencia para el Desarrollo Embrionario. *Información tecnológica*, 25(2), 141-150.
- Veer S. & Jitender N. (2017). Economics and Importance of Beekeeping. Department of Agricultural Economics, Haryana Agricultural University, Hisar 123005, India.
- Venereo Gutiérrez, J. R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de medicina militar*, 31(2), 126-133.
- Walczak–Jedrzejska, R., Wolski, J. K., & Slowikowska–Hilczek, J. (2013). The role of oxidative stress and antioxidants in male fertility. *Central European journal of urology*, 66(1), 60.
- Watson P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*. 7:871– 891.
- Wegener, J., May, T., Knollmann, U., Kamp, G., Müller, K., et al. (2012) In vivo validation of in vitro quality tests for cryopreserved honey bee semen. *Cryobiology* 65 (2), 126–131.
- Weirich, G. F., Collins, A. M., & Williams, V. P. (2002). Antioxidant enzymes in the honey bee, *Apis mellifera*. *Apidologie*, 33(1), 3-14.

- World Health Organization: WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Fifth edition, 2010.
- Wright, G. A., Nicolson, S. W., & Shafir, S. (2018). Nutritional physiology and ecology of honey bees. *Annual review of entomology*, 63, 327-344.
- Yeste, M. (2016). Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, 85(1), 47-64.
- Zahmatkesh, E., Najafi, G., Nejati, V., & Heidari, R. (2014). Protective effect of royal jelly on the sperm parameters and testosterone level and lipid peroxidation in adult mice treated with oxymetholone. *Avicenna journal of phytomedicine*, 4(1), 43.
- Zhao, N., Chen, S., Hong, Y., & Tang, B. Z. (2015). A red emitting mitochondria-targeted AIE probe as an indicator for membrane potential and mouse sperm activity. *Chemical Communications*, 51(71), 13599-13602.
- Zhu, A., Romero, R., & Petty, H. R. (2011). An enzymatic colorimetric assay for glucose-6-phosphate. *Analytical biochemistry*, 419(2), 266-270.

X. ANEXOS

10.1 Anexo 1 – Resumen del número de zánganos trabajados en la temporada artificial y natural

Relación del número de zánganos trabajados, días de llegada y día de evaluación de los zánganos y obreras enviadas por la AAA-AP.

COLMENAS	ALTITUD (msnm)	Nº de abejas trabajadas	ZÁNGANOS		OBRERAS		Día de llegada	Día de evaluación
			VIVOS	MUERTOS	VIVOS	MUERTOS		
Col.1.A	560	9	9	16	3	1	18/01/2018	19/01/2018
Col.2.A	560	12	12	13	5	2	18/01/2018	19/01/2018
Col.3.A	560	18	18	9	10	2	21/01/2018	22/01/2018
Col.4.A	1030	24	24	3	14	1	07/01/2018	08/01/2018
Col.5.A	530	25	25	2	14	2	11/01/2018	12/01/2018
Col.6.A	525	14	14	10	6	1	11/01/2018	12/01/2018
Col.7.A	1000	19	19	6	13	1	12/01/2018	13/01/2018
Col.8.A	1000	26	26	5	10	11	21/01/2018	22/01/2018
Col.9.A	580	7	7	11	3	1	14/01/2018	15/01/2018
Col.10.A	560	15	15	4	17	0	21/01/2018	22/01/2018
Col.1.N	770	24	24	4	6	0	05/09/2018	05/09/2018
Col.2.N	960	46	46	4	20	5	05/09/2018	05/09/2018
Col.3.N	1000	16	16	9	8	2	05/09/2018	05/09/2018
Col.4.N	950	35	35	9	9	1	06/09/2018	06/09/2018
Col.5.N	1100	40	10	40	11	4	06/09/2018	06/09/2018
Col.6.N	960	25	25	32	3	0	13/09/2018	13/09/2018
Col.7.N	1100	43	43	7	17	2	13/09/2018	13/09/2018
Col.8.N	1100	47	0	47	6	14	17/09/2018	17/09/2018
Col.9.N	1000	22	22	1	9	0	18/09/2018	18/09/2018
Col.10.N	1050	22	22	1	8	2	18/09/2018	18/09/2018

10.2 Anexo 2 - Preparación del medio de nutrición HAM F-10

En el cuadro se detallan los reactivos y las cantidades necesarias para preparar un volumen final de 1L

Ham F-10 (1L)	
Nutrient Mixture	9,8g
Ham F-10	
Penicilina	0,075g
Estreptomicina	0,075g
Lactato de calcio	0,245g
Bicarbonato	2,1g

10.3 Anexo 3 - Lisis celular

Se emplearon dos técnicas de lisis celular, física a la izquierda y química a la derecha, ambas dan resultados sin diferencias significativas.

LECTURAS ESPECTOFOTOMÉTRICAS TOTALES Y DETERMINACIÓN DEL PESO DEL FORMAZÁN										
ENSAYOS	PRE CRIOPRESERVACIÓN / SONICACIÓN					PRE CRIOPRESERVACIÓN / KOH 2M				
	ABS	ABS - BLANCO	FINAL	F.D.	[] µg/ml	ABS	ABS - BLANCO	FINAL	F.D.	[] µg/ml
1 sin	0,012	0,009				0,027	0,021			
1 con	0,029	0,023	0,014	0,028	17,04	0,060	0,054	0,033	0,066	25,51
2 sin	0,011	0,009				0,027	0,021			
2 con	0,016	0,010	0,001	0,002	11,25	0,052	0,046	0,025	0,050	21,95
3 sin	0,010	0,009				0,027	0,021			
3 con	0,036	0,030	0,021	0,042	20,16	0,041	0,035	0,014	0,028	16,60
4 sin	0,015	0,009				0,027	0,021			
4 con	0,043	0,037	0,028	0,056	23,28	0,033	0,027	0,006	0,012	13,47
5 sin	0,015	0,009				0,027	0,021			
5 con	0,023	0,017	0,008	0,016	14,37	0,036	0,030	0,009	0,018	14,81
6 sin	0,026	0,009				0,027	0,021			
6 con	0,030	0,024	0,015	0,030	17,49	0,036	0,030	0,009	0,018	14,81
7 sin	0,011	0,009				0,027	0,021			
7 con	0,030	0,024	0,015	0,030	17,49	0,030	0,024	0,003	0,006	12,14
8 sin	0,015	0,009				0,027	0,021			
8 con	0,039	0,033	0,024	0,048	21,50	0,040	0,034	0,013	0,026	16,60
9 sin	0,019	0,009				0,027	0,021			
9 con	0,030	0,024	0,015	0,030	17,49	0,030	0,024	0,003	0,006	12,14
10 sin	0,016	0,009				0,027	0,021			
10 con	0,016	0,010	0,001	0,002	11,25	0,030	0,024	0,003	0,006	12,14

10.4 Anexo 4 – Diferencia significativa entre colmenas pre criopreservación de la segunda temporada para el MET%

MET% pre criopreservación

HSD Tukey^a

COLMENAS	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Col. 7.N	4	34,6325		
Col. 8.N	4	35,8050		
Col. 6.N	4	40,1975	40,1975	
Col. 4.N	4	53,5850	53,5850	53,5850
Col. 1.N	4	55,0575	55,0575	55,0575
Col. 2.N	4		60,9625	60,9625
Col. 5.N	4			64,9250
Sig.		,070	,064	,616

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.

10.5 Anexo 5 – Diferencia significativa entre colmenas pre criopreservación de la segunda temporada para la integridad de membrana

Host+ (%) pre criopreservación

HSD Tukey^a

COLMENAS	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Col. 6.N	4	46,3400	
Col. 7.N	4	46,4250	
Col. 5.N	4	59,4225	59,4225
Col. 8.N	4	61,2875	61,2875
Col. 4.N	4	67,8175	67,8175
Col. 2.N	4		70,8225
Col. 1.N	4		74,2050
Sig.		,059	,345

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.

10.6 Anexo 6 – Diferencia significativa entre colmenas pre criopreservación de la segunda temporada para la actividad mitocondrial

NBT+ (%) pre criopreservación

HSD Tukey^a

COLMENAS	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Col. 2.N	4	50,7925	
Col. 8.N	4	58,4000	58,4000
Col. 6.N	4	63,2825	63,2825
Col. 5.N	4	67,8150	67,8150
Col. 7.N	4	68,1500	68,1500
Col. 4.N	4		77,9300
Col. 1.N	4		78,5825
Sig.		,148	,063

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 4,000.

10.7 Anexo 7 – Relación de colmenas expuestas a miticidas y agroquímicos de la temporada artificial y de la temporada natural

	COD.DE COLM /Nº COLM	Nº COLM EN LAB.	APICULTOR	ZONAS	Polinización**	
T. ARTIFICIAL	01-18 PERENE	Col.1.A	Nilson Conovilca Camasca	Perené	no se envió	2018**
	02-18-PERENE	Col.2.A	Waly Ortiz Yurivilca	Perené	no se envió	2018**
	03-18-PERERE	Col.3.A	Gustino Camacho Rodriguez	Perené	no se envió	2018**
	04-17-PICHANAKI	Col.4.A	Teodocio Allcca Cusi	Pichanaki	2014	no envía
	05-17-PICHANAKI	Col.5.A	Javier Wete Quincho	Pichanaki	2016	2018**
	06-18-PICHANAKI	Col.6.A	Nerida Socualaya	Pichanaki	no se envió	no envía
	07-18-PICHANAKI	Col.7.A	Alex Cóndor Yarasca	Pichanaki	2016	2018**
	08-18-PICHANAKI	Col.8.A	Jhony Amaro Cosme	Pichanaki	2014	no se envió
	09-18-PERENE	Col.9.A	Nilson Conovilca Camasca	Pichanaki	no se envió	2018**
	10-18-PICHANAKI	Col.10.A	Geremias Allcca Porras	Pichanaki	no se envió	2018**
T. NATURAL	Colmena 31	Col.1.N	Ronal Cárdenas Figueroa	Pichanaki	no se envió	no envía
	Colmena 9	Col.2.N	José Antonio Encinas	Pichanaki	2016	2018**
	Colmena 21	Col.3.N	Alex Cóndor Yarasca	Pichanaki	no se envió	2018**
	Colmena 25	Col.4.N	Eusebio Laura León	Pichanaki	no se envió	2018**
	Colmena 40	Col.5.N	Sonia Taccsa Aguirre	Pichanaki	2016	2018**
	Colmena 6	Col.6.N	Geremias Allcca Porras- JAE	Pichanaki	2016	no se envió
	Colmena 35	Col.7.N	Lucio De la Cruz Aquino	Pichanaki	2016	2018**
	Colmena 12	Col.8.N	Teodocio Allcca Cusi	Pichanaki	2014	no envía
	Colmena 1	Col.9.N	Elvis Tapia Caynicela	Pichanaki	no se envió	2018**
	Colmena 20	Col.10.N	Elvis Tapia Caynicela	Rio Negro	no se envió	2018**